

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



Implementação e Validação de Métodos de Ensaio para a Monitorização de Compostos Orgânicos em Águas usando Amostradores Passivos

Miguel Velez Rodrigues da Silva

Mestrado em Química Tecnológica

Dissertação orientada por:
Prof. Maria José Lourenço
Vitor Vale Cardoso

Resumo

A amostragem pontual (amostragem tradicional com frascos) limita-se apenas a captar informações momentâneas sobre a qualidade do ambiente aquático. Este tipo de amostragem não tem em consideração a dinâmica dos processos ambientais, uma vez que as condições do meio aquático podem ser modificadas num curto intervalo de tempo, causadas por exemplo, por precipitação abundante ou descargas industriais. Desta forma, a análise da água fica comprometida com este tipo de amostragem, sendo necessário um maior número de recolhas de amostras, o que tornaria todo o processo de amostragem mais demorado, trabalhoso e dispendioso.

Os amostradores passivos permitem captar, de uma forma integrativa, os analitos na fase adsorvente, detetar e determinar a concentração média de contaminantes durante o período de amostragem, reduzindo os custos pelo facto de um único dispositivo conseguir recolher informações sobre a presença de compostos orgânicos numa grande área, durante esse período.

Este trabalho resultou de um protocolo de colaboração estabelecido entre a EPAL – Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A. e a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, com o objetivo de desenvolver um método que permitisse a recuperação eficaz de um grupo de poluentes, os HAP – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos, após adsorção nos amostradores passivos.

A primeira parte do trabalho consistiu na otimização de um processo de extração pelo sistema de ultrassons, após adsorção de uma mistura de HAP num nível de concentração conhecido, para os amostradores passivos em estudo: SPMD, POCIS - Pesticidas e POCIS –Fármacos.

A condição ótima de extração dos HAP pelo sistema de ultrassons para o amostrador SPMD foi obtida em modo fracionado, durante 1h 30 min (30 min + 30 min + 30 min), com ciclohexano.

Posteriormente, os amostradores passivos foram colocados num reservatório de água de consumo durante dois períodos distintos - 10 dias e 6 meses. Após adsorção e submissão a processo de extração adequado, efetuou-se a análise do extrato por HPLC-DAD-FLD para a monitorização de HAP, e a análise por GC-MS em modo *Full scan* para pesquisa de outros compostos orgânicos que tenham sido adsorvidos pelo amostrador passivo.

Relativamente à monitorização de HAP, não foram encontrados vestígios significativos destes compostos no local de amostragem estudado. Quanto a outros compostos orgânicos, constatou-se que os amostradores possuem afinidade para compostos constituintes de massas lubrificantes e compostos formados durante o processo de desinfecção das águas com cloro.

Palavras-chave: HAP, Amostradores passivos, SPMD, POCIS, Ultrassons, ASE, HPLC, GC-MS

Abstract

Traditional sampling (traditional sampling with flasks) is limited to only getting momentary information on the quality of the aquatic environment. This type of sampling does not take into account the dynamics of environmental processes, since the conditions of the aquatic environment can be modified in a short time, caused for example by abundant precipitation or industrial discharges. Thus, water analysis is compromised with this type of sampling, requiring a greater number of sample collections, which would make the entire sampling process more time-consuming, laborious and expensive.

Passive samplers allow the integrative capture of analytes in the adsorbent phase, detect and determine the mean concentration of contaminants during the sampling period, reducing costs because a single device can collect information about the presence of organic compounds in a large area, during that period.

This work is the result of a collaboration protocol established between EPAL - Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A. and the Faculty of Sciences of the University of Lisbon, with the goal of developing a method that would allow the effective recovery of a group of pollutants, PAH - Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, after adsorption on passive samplers.

The first part of the work consisted in the optimization of an extraction process by ultrasonic system, after adsorption of a mixture of PAHs at a known concentration level, in the passive samplers under study: SPMD, POCIS-Pesticides and POCIS-Drugs,

The PAH optimal extraction condition by the ultrasonic system for the SPMD sampler was obtained in fractional extraction mode during 1h 30 min (30 min + 30 min + 30 min) with cyclohexane.

Afterwards, the passive samplers were placed in a drinking water reservoir during two distinct periods - 10 days and 6 months. After adsorption and submission to an appropriate extraction process, the extract was analyzed by HPLC-DAD-FLD for monitoring of PAH, and by GC-MS in Full Scan mode to investigate other organic compounds that have been adsorbed by the passive sampler.

Concerning the monitoring of PAH, no significant traces of these compounds were found at this sampling site. In the monitoring of others organic compounds, it was found that the samplers have affinity for lubricants constituents and compounds formed during the waters disinfection process.

Keywords: PAH, Passive Samplers, SPMD, POCIS, Ultrasonic, ASE, HPLC, GC-MS

Agradecimentos

Dedico este espaço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação, que no fundo marca a conclusão de mais uma importante etapa na minha vida.

Ao Dr. Vítor Cardoso, orientador deste trabalho, um agradecimento muito especial por todo o conhecimento científico transmitido, pelo acompanhamento e motivação, pelas sugestões e críticas dadas ao longo do trabalho e pela amabilidade e forma acolhedora como me recebeu.

À Prof. Maria José Lourenço, orientadora deste trabalho, agradeço por todo o interesse e disponibilidade, bem como pelo aconselhamento e apoio no decurso do trabalho.

À Equipa de Química Orgânica: Alexandre Rodrigues, Ana Neto, Ana Penetra, João Rodrigues, António Pato, Marta Loureiro, Cristina Correia e Júlia Robalo, agradeço por toda a ajuda, pelo conhecimento, paciência e boa vontade demonstrados.

Agradeço também aos colegas que me acompanharam no meu percurso no laboratório, nomeadamente, ao João Ramos, Bárbara Pereira, Miguel Domingues, Carla Antunes e Edgar Reis, pelos momentos de descontração e boa disposição, pelo ânimo, entreajuda e motivação partilhados ao longo do tempo.

Por último, agradeço à minha família, especialmente à minha mãe por todo o apoio, carinho e amor, por estar sempre presente nos momentos de alegria e angústia, pelas partilhas, crescimento e sobretudo, por acreditar em mim.

A todos muito obrigado.

Índice

Resumo	i
Abstract	ii
Agradecimentos	iii
Índice de Figuras	vii
Índice de Tabelas	ix
Índice de Gráficos	xi
Lista de Símbolos e Abreviaturas	xii
1. Introdução	1
1.1. Água - um recurso valioso	1
1.2. Empresa Portuguesa das Águas Livres	2
1.2.1. Apresentação da Empresa	2
1.2.2. Controlo de Qualidade	4
1.3. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos	5
1.3.1. Aspetos gerais e propriedades físico-químicas	5
1.3.2. Metabolismo e Toxicidade	8
1.3.3. Distribuição no Ambiente e os Incêndios Florestais	10
1.4. Amostragem	12
1.4.1. Amostragem Passiva	12
1.4.1.1. SPMD	17
1.4.1.2. POCIS	21
1.5. Metodologia Analítica	23
1.5.1. Técnicas de Preparação da amostra	24
1.5.1.2. Extração Assistida por Ultrassons	24
1.5.1.2. Extração em Fase Sólida	25
1.5.1.3. Extração Acelerada por Solvente	27
1.5.1.2.1. Preparação da amostra	29
1.5.1.2.2. Extração	29
1.5.1.3. Concentração e troca de solvente	33
1.5.2. Cromatografia - Princípios Gerais	34
1.5.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	39
1.5.2.1.1. Coluna Cromatográfica	40

1.5.2.1.2. Detetores.....	41
1.6. Validação dos Resultados.....	45
1.6.1. Avaliação Indireta	45
1.6.1.2. Especificidade/Seletividade	45
1.6.1.3 Linearidade e Gama de Trabalho	45
1.6.1.4. Precisão	46
1.6.2. Avaliação Direta.....	47
1.6.2.1. Ensaio de Recuperação	47
2. Parte Experimental	48
2.1. Equipamento e Material	48
2.1.1. Equipamento.....	48
2.1.2. Material	48
2.1.3. Reagentes e soluções	49
2.1.3.1 Reagentes gerais	49
2.1.3.2. Padrões	49
2.2. Análise dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos	50
2.2.1. Soluções Padrão Comercial de HAP.....	50
2.2.2. Preparação da Solução Padrão Intermédia	51
2.2.3. Preparação das Soluções Padrão de Calibração	51
2.2.4. Solução Padrão de Controlo	52
2.2.5. Condições Cromatográficas.....	52
2.3. Ensaio de Recuperação	53
2.3.1. Amostragem Passiva na Recuperação dos HAP	53
2.4. Técnicas de Preparação de amostra na recuperação dos HAP	55
2.5. Utilização dos Amostradores Passivos <i>in loco</i>	56
2.6. Análise de Compostos Desconhecidos	57
2.6.1. Soluções Padrão Primárias dos Padrões Internos Deuterados.....	57
2.6.2. Solução Padrão Conjunta dos Padrões Internos Deuterados	58
2.6.4. Solução Padrão Primária de Injeção	58
2.6.5. Solução Padrão de Fortificação do Padrão de Injeção	59
2.6.6. Solução Teste da Coluna de GC	59
2.6.7. Preparação da Amostra.....	59
2.6.8. Condições Cromatográficas.....	60

2.6.9. Identificação dos Compostos Detetados	60
2.6.10. Estimativa Semi-quantitativa da Concentração dos Compostos Detetados	61
3. Discussão e Resultados	62
3.1. Caracterização dos Amostradores	62
3.2. Otimização do método de preparação de amostra: Ultrassons	64
3.2.1. Tipo de solvente e <i>clean-up</i>	64
3.2.2. Tipo de amostrador	65
3.2.3. Tempo de Exposição	66
3.2.4. Quantidade de solvente e número de extrações	67
3.2.5. Modo de Extração	68
3.2.6. Método Clássico vs. Método otimizado	68
3.3. Estudo comparativo entre as técnicas de preparação de amostra na recuperação de HAP: SPE vs ASE	70
3.4. Estudo inicial do método preparação de amostra: ASE	71
3.5. Utilização dos amostradores passivos no Reservatório dos Olivais	72
4. Conclusões e Perspetivas Futuras	78
5. Bibliografia	80
6. Anexos	i
Anexo I - Legislação relativa à qualidade da água	i
Anexo II - Legislação relativa aos amostradores passivos e sua utilização na comunidade internacional	iv
Anexo III – Condições de deteção dos HAP no detetor de fluorescência e respetivos tempos de retenção no cromatograma	v
Anexo IV – Cromatograma típico dos HAP obtido por HPLC-DAD-FLD	vi
Anexo V – Resultados do Teste Estatístico dos Diferentes Dias de Exposição (SPSS)	vii
Anexo VI – Resultados do Teste Estatístico dos Diferentes Volumes de Solvente (SPSS)	x

Índice de Figuras

Figura 1.1 - Esquema geral do sistema de abastecimento da EPAL	3
Figura 1.2 - Sistema de Abastecimento da EPAL.....	3
Figura 1.3 - Organograma da LAB.....	4
Figura 1.4 - Estrutura química dos 16 HAP considerados poluentes prioritários pela US EPA ^[13]	6
Figura 1.5 - Fases de captação dos analitos pelos amostradores passivos. (Adaptado de [25])	13
Figura 1.6 - Configuração de alguns dispositivos usados na análise de águas: (a) Chemcatcher, (b) Dosímetro Cerâmico, (c) DGT - Diffusion gradient in thin-film ^[24, 31,32]	15
Figura 1.7- Amostrador SPMD no suporte metálico	17
Figura 1.8 - Configuração do SPMD e exclusão molecular dos poluentes pela membrana (Adaptado de [38]).....	18
Figura 1.9 - Configuração do POCIS [24]	21
Figura 1.10 - Etapas principais do método analítico: caso de estudo.....	23
Figura 1.11 - Etapas envolvidas na SPE (adaptado de [62])	26
Figura 1.12 - Equipamento ASE 350 da Dionex (Adaptado de [66])	27
Figura 1.13 - Processo de extração acelerada por solvente pelo aparelho ASE 350 (Adaptado de [66])	30
Figura 1.14 - Células de extração: Dionum e aço inoxidável ^[72]	31
Figura 1.15 - Constituintes das células de extração ^[73]	32
Figura 1.16 - Equipamento Turbovap e esquema do seu funcionamento	33
Figura 1.17 – Cromatograma típico com identificação dos parâmetros teóricos mais importantes ..	35
Figura 1.18 - Representação da equação de Van Deemter.....	37
Figura 1.19- Efeito dos múltiplos caminhos no alargamento do pico Adaptado de [78])	38
Figura 1.20 - Componentes do HPLC (Adaptado de [80]).	39
Figura 1.21 - Mecanismo de ligação dos grupos funcionais à sílica (Adaptado de [82])	40
Figura 1.22 - Detetor de díodos (Adaptado de [84]).....	42
Figura 1.23 - Representação simplificada da absorção numa molécula	43
Figura 1.24 - Representação simplificada da emissão de radiação numa molécula (fluorescência) ..	43
Figura 1.25 - Detetor de fluorescência	44

Figura 2.1 - Amostrador imerso em água fortificada com HAP	54
Figura 2.2 - Local de amostragem no Reservatório dos Olivais (esquerda); Configuração da gaiola de aço inoxidável com os suportes dos amostradores (direita)	56
Figura 2.3 - Adsorvente do POCIS- Pesticidas (esquerda) e Fármacos (direita) com terra de diatomáceas	56
 Figura 3.1 - Imagem do POCIS por uma lupa eletrónica com ampliação x 27	62
Figura 3.2 - Imagem do POCIS por FEG-SEM JSM 700 1F.....	62
Figura 3.3 – Imagem do SPMD por FEG-SEM JSM 700 1F	63
 Figura 6.1 - Cromatograma típico dos HAP obtido por HPLC-DAD-FLD	vi

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas dos 16 HAP prioritários pela US EPA ^[14]	7
Tabela 1.2 - Classificação dos compostos químicos com potencial atividade carcinogénica ^[18]	9
Tabela 1.3 - Classificação dos 16 HAP poluentes prioritários pela IARC ^[18]	10
Tabela 1.4 - Características dos amostradores passivos ^[33]	16
Tabela 1.5 - Compostos comuns detetados pelo SPMD ^[35]	19
Tabela 1.6 - Comparação dos métodos de extração na recuperação de HAP do SPMD	20
Tabela 1.7 - Compostos detetados pelo POCIS ^[44]	22
Tabela 1.8 - Vantagens e desvantagens da ASE ^[74]	32
Tabela 1.9 - Colunas de fase ligada: fases polares e apolares mais representativas ^[82]	41
Tabela 1.10 - Limites de deteção aproximados para os detetores mais utilizados em HPLC com eluição por gradiente ^[82]	41
 Tabela 2.1 - Concentração dos HAP na mistura padrão comercial	50
Tabela 2.2 - Concentrações individuais dos HAP na Solução Padrão Intermédia	51
Tabela 2.3 - Preparação das Soluções Padrão de Calibração	51
Tabela 2.4 - Concentração dos HAP nas Soluções Padrão de Calibração.....	52
Tabela 2.5 - Condições do HPLC-FLD-DAD	53
Tabela 2.6 - Concentração das soluções padrão primárias dos padrões internos deuterados	58
Tabela 2.7 - Concentração de cada padrão interno deuterado na solução conjunta	58
Tabela 2.8 - Concentração de cada padrão interno deuterado na solução teste da coluna de GC	59
Tabela 2.9 - Condições do GC-MS	60
 Tabela 3.1 - Condições de extração para os amostradores passivos	72
Tabela 3.2 - Compostos orgânicos desconhecidos detetados pelo amostrador POCIS Pesticidas (n=2) com 10 dias de exposição	73
Tabela 3.3 - Compostos orgânicos desconhecidos detetados pelo amostrador SPMD (n=2) com 10 dias de exposição	73
Tabela 3.4 - Compostos orgânicos desconhecidos detetados pelo amostrador POCIS Fármacos (n=2) com 10 dias de exposição	74
Tabela 3.5 - Compostos orgânicos desconhecidos detetados pelo amostrador POCIS Pesticidas (n=2) com 6 meses de exposição	74

Tabela 3.6 - Compostos orgânicos desconhecidos detetados pelo amostrador POCIS Fármacos (n=2) com 6 meses de exposição	75
Tabela 3.7 - Compostos orgânicos desconhecidos detetados pelo amostrador SPMD (n=2) com 6 meses de exposição	76
Tabela 6.1 - Normas de qualidade tendo em conta a concentração máxima admissível(NQA-CMA) e a média anual (NQA-MA) em águas superficiais de alguns HAP considerados poluentes prioritários.	ii
Tabela 6.2 - Condições de deteção dos HAP no detetor de fluorescência	v
Tabela 6.3 - Tempos de retenção aproximados dos HAP no cromatograma.....	v

Índice de Gráficos

Gráfico 3.1 - Recuperações dos compostos extraídos com o ciclohexano, acetonitrilo e diclorometano ao fim de 1h 30min.....	64
Gráfico 3.2 - Medianas das recuperações obtidas em função dos dias de exposição	66
Gráfico 3.3 - Média das recuperações obtidas com diferentes quantidades de solvente (ciclohexano)	67
Gráfico 3.4 - Comparação das recuperações obtidas pelo o método de extração simples e fracionada	68
Gráfico 3.5 - Comparação das recuperações obtidas pelo o método de diálise e ultrassons	69
Gráfico 3.6 - Comparação da recuperação com as duas técnicas: ASE vs SPE	70
Gráfico 3.7 – Comparação das recuperações obtidas pela ASE, a 50 °C, com ciclohexano, hexano e diclorometano	71
 Gráfico 6.1 - Blox-plot 1	 vii
Gráfico 6.2 - Blox-plot 2	x

Lista de Símbolos e Abreviaturas

AdP	Águas de Portugal
AdVT	Águas do Vale do Tejo
ASE	<i>Accelerated Solvent Extraction</i> , Extração Acelerada com Solvente
BHT	<i>Butylated Hydroxytoluene</i> , Hidroxitolueno Butilado
DAD	<i>Diode-Array Detector</i> , Detetor de Díodos
DCM	Diclorometano
DEET	<i>N,N</i> -dietil-3-metilbenzamida
DGT	<i>Diffusion Gradient in Thin-film</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> , Ácido Desoxirribonucleico
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> , Agência de Proteção Ambiental
EPAL	Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A.
ETA	Estação de Tratamento de Águas
FEG-SEM	<i>Field-Emission Gun Scanning Electron Microscope</i>
FLD	<i>Fluorescence Detector</i> , Detetor de Fluorescência
GC-MS	<i>Gas Chromatography–Mass Spectrometry</i> , Cromatografia Gasosa acoplada à Espetrometria de Massa
HAP	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> , Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> , Agência Internacional para a Investigação no Cancro
LAB	Direção Laboratórios e de Controlo da Qualidade da Água
LDPE	<i>Low-Density Polyethylene</i> , Polietileno de Baixa Densidade
K _{ow}	Coefficiente de Partição Octanol/Água
MAE	<i>Microwave assisted Extraction</i> , Extração Assistida por micro-ondas
MDMA	3,4-Metilenodioximetilanfetamina
POCIS	<i>Polar Organic Chemical Integrative Sampler</i> , Amostrador Integrativo de Compostos Orgânicos Polares

PCB	<i>Polychlorinated Biphenyl</i> , Bifenilos Policlorados
PTFE	<i>Polytetrafluoroethylene</i> , Politetrafluoretileno
SPMD	<i>Semipermeable membrane Devices</i> , Dispositivo de membrana semipermeável
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> , Extração em Fase Sólida
UAE	<i>Ultrasonic Assisted Extraction</i> , Extração Assistida por Ultrassons
UV-Vis	Radiação Ultravioleta-Visível

1. Introdução

1.1. Água - um recurso valioso

A água constitui um elemento fundamental nos ecossistemas, sendo essencial à sobrevivência humana e de toda a biosfera.

O Homem utiliza a água diariamente em inúmeras situações para benefício próprio e o acesso a água potável e segura é crucial para a saúde pública. No entanto, a quantidade de água doce disponível no planeta é limitada e a sua qualidade está sob pressão constante. A nível mundial, o consumo de água potável tem sido superior à capacidade natural de regeneração dos recursos hídricos. Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2025, metade da população mundial viverá em áreas afetadas pelo *stress* hídrico.^[1] Atualmente, as alterações climáticas, o aumento da escassez de água, o crescimento demográfico, a urbanização e industrialização já representam desafios para os sistemas de abastecimento de água. Ainda se verificam desigualdades geográficas, socioculturais e económicas quanto ao acesso a água potável, principalmente entre as áreas rurais e urbanas.

A poluição antropogénica associada ao uso dos pesticidas, solventes orgânicos, produtos químicos, medicamentos, compostos resultantes dos resíduos industriais e domésticos e respetivos produtos de degradação representam a maior parte da contaminação ambiental. O destino destes compostos no ambiente é variável e alguns deles não sofrem alterações durante os processos de tratamento das águas residuais. A poluição das águas superficiais pelos contaminantes químicos provocam a degradação da qualidade da água e, consequentemente, desequilíbrios nos ecossistemas aquáticos, o enfraquecimento dos biótopos e a diminuição da biodiversidade.^[2]

Para além do impacte ambiental causado pela atividade humana, as águas contaminadas também são um veículo de transmissão de doenças como a cólera, disenteria, hepatite A, febre tifóide e poliomielite, responsáveis por cerca de 280 000 mortes por ano nos países em desenvolvimento.^[1]

Como recurso natural indispensável à vida, a água utilizada pelo Homem deve possuir características de potabilidade, ou seja, não apresentar nenhum risco significativo para a saúde do ponto de vista químico, biológico e ao mesmo tempo ser esteticamente agradável. Deste modo, é necessário tomar medidas preventivas, nomeadamente, a criação de um sistema de gestão que vise proteger as bacias hidrográficas e todos os recursos hídricos usados para a produção de água destinada ao consumo humano, a eliminação criteriosa e cuidada dos resíduos através de processos de tratamento de água potável e o desenvolvimento e implementação de padrões de qualidade para a água, os quais devem ser aplicados aos planos de monitorização das águas.^[1,3]

O objetivo principal das entidades gestoras de abastecimento de água para consumo é comprovar e garantir o nível de qualidade da água através do cumprimento da legislação em vigor, manter o controlo operacional que permita identificar possíveis anomalias na qualidade da água e, desta forma, pôr em prática medidas preventivas e corretivas.^[3]

1.2. Empresa Portuguesa das Águas Livres

1.2.1. Apresentação da Empresa

A EPAL- Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A. é uma empresa do sector empresarial do Estado cuja atividade está orientada para a captação, produção, transporte e distribuição de água para consumo humano.

A EPAL, inicialmente designada Empresa Pública das Águas de Lisboa, é desde 1974 sucessora da antiga Companhia das Águas de Lisboa, passando em 1981 a designar-se Empresa Pública das Águas Livres. Em 1991, em consequência do decreto-lei nº 230/91, a Empresa Pública das Águas Livres é transformada numa sociedade anónima de capitais totalmente públicos, conferindo assim maior flexibilidade de gestão para concretizar o seu desenvolvimento estratégico e realizar a sua missão, com a denominação de EPAL – Empresa Portuguesa das Águas Livres, S.A. Dois anos mais tarde, em 1993, é integrada no, então criado, Grupo AdP – Águas de Portugal SGPS, S.A., que detém 100% da EPAL.

Atualmente, a EPAL, juntamente com a AdVT (Águas do Vale do Tejo), é responsável pela concessão da exploração e gestão do Sistema Multimunicipal de Abastecimento de Água e de Saneamento do Vale do Tejo, que abrange 87 municípios, ocupando uma área territorial correspondente a 33% do território continental português e servindo 3,8 milhões de habitantes.^[4]

O sistema de abastecimento da EPAL é responsável pela captação, tratamento, transporte e distribuição da água necessária aos consumidores, com uma capacidade nominal de produção que pode atingir mais de 1.000.000 m³/dia e uma capacidade de reserva de cerca de 370.000 m³. As principais origens de água do sistema são superficiais – albufeira de Castelo do Bode (rio Zêzere), o maior e mais relevante, representando hoje cerca de 75% da capacidade de produção da empresa, e a margem direita do rio Tejo, em Valada, existindo também cerca de 20 captações subterrâneas localizadas em Alenquer, Lezírias e Ota.^[5]

A água captada é submetida a uma etapa de tratamento desde a fase de captação até à fase de distribuição. Após a captação na albufeira de Castelo de Bode, a água é transportada para a ETA da Asseiceira. A ETA de Vale da Pedra recebe a água proveniente da captação superficial do Rio Tejo. Nas captações subterrâneas o tratamento aplicado consiste na desinfecção por cloro. Nos poços de Alenquer existe ainda uma estação de decarbonatação que trata a água captada, com o intuito de diminuir a sua dureza e alcalinidade.



Figura 1.1 - Esquema geral do sistema de abastecimento da EPAL

A água produzida é aduzida ao sistema por meio dos adutores de Castelo do Bode e do Tejo. No percurso até Lisboa e para entrega aos municípios são ainda utilizadas outras importantes infraestruturas de transporte como o aqueduto Alviela, o adutor Vila Franca de Xira-Telheiras, o adutor de Circunvalação e o adutor da Costa do Sol. ^[5]

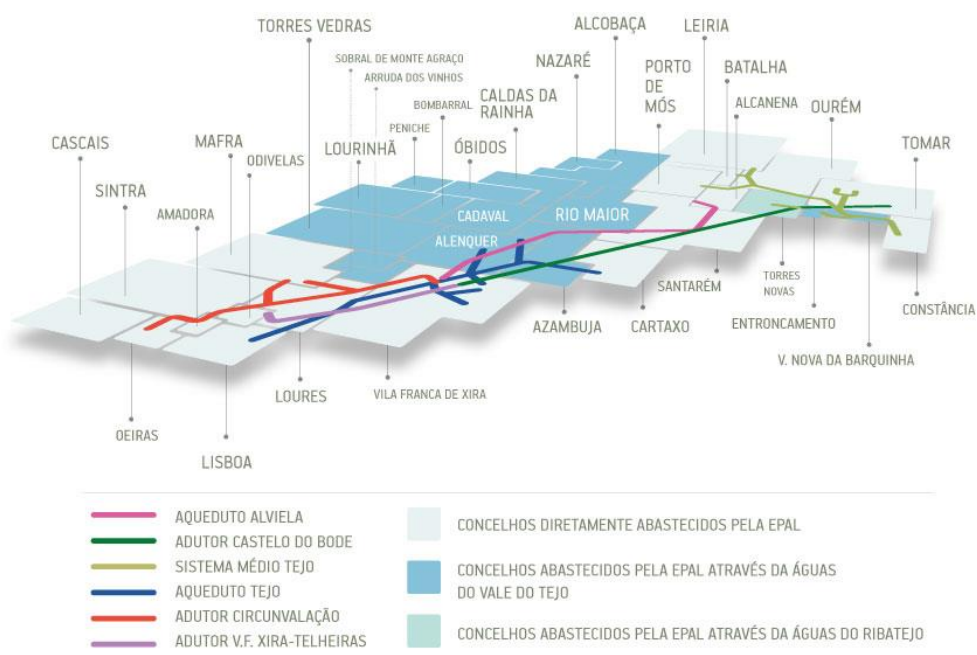


Figura 1.2 - Sistema de Abastecimento da EPAL

1.2.2. Controlo de Qualidade

A Direção Laboratórios e de Controlo da Qualidade da Água (LAB), que integra os laboratórios de ensaio da EPAL, localizados em Lisboa e na ETA de Vale da Pedra, é o órgão da EPAL que tem a responsabilidade de proceder à conceção, implementação e gestão do Plano de Controlo da Qualidade da Água no Sistema de Abastecimento da EPAL (PCQA).

O Plano de Controlo da Qualidade da Água no Sistema de Abastecimento da EPAL (PCQA) é estabelecido e aprovado pelo Conselho de Administração da EPAL anualmente de modo a abranger toda a extensão do sistema, tendo em conta o cumprimento da legislação em vigor, a proteção da saúde do consumidor e o nível de segurança da água.

A Direção Laboratórios e de Controlo da Qualidade da Água da EPAL está acreditada desde 1999, segundo a norma NP EN ISO/IEC 17025 - “Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração”, para a colheita, preservação e transporte de amostras de água (para águas de consumo humano e águas naturais destinadas à produção de águas para consumo humano), para análise de 110 parâmetros da qualidade da água (correspondendo a 198 compostos), para 135 métodos analíticos de ensaios em águas e para testes a materiais orgânicos em contacto com água para consumo humano. ^[6]

A evolução tecnológica registada nos laboratórios de controlo de qualidade da EPAL esteve sempre associada à evolução do conhecimento dos riscos para a saúde provocados pela contaminação microbiológica e química, investindo-se continuamente em novas tecnologias em função da rapidez de disponibilização de resultados e dos limites de quantificação e precisão cada vez mais exigentes.

O Laboratório de Análises de Água da EPAL, em Lisboa, local onde foi desenvolvido este trabalho, está dividido em três áreas analíticas distintas: Microbiologia e Biologia, Química Inorgânica e Química Orgânica, onde são realizados ensaios de diferentes parâmetros microbiológicos, organolépticos, biológicos e físico-químicos. No caso dos parâmetros químicos existem uma série de compostos orgânicos que são monitorizados, de modo a garantir a qualidade da água, nomeadamente subprodutos da desinfecção (trihalometanos, ácidos haloacéticos e clorofenóis), pesticidas, bifenilos policlorados (PCB), bisfenol A, compostos orgânicos voláteis, acrilamida, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), hidrocarbonetos dissolvidos, óleos e gorduras, microcistinas, hormonas e compostos farmacêuticos. ^[6]



Figura 1.3 - Organograma da LAB

1.3. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

1.3.1. Aspectos gerais e propriedades físico-químicas

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) representam uma vasta família de compostos orgânicos constituídos por dois ou mais anéis aromáticos condensados e são maioritariamente formados em processos de combustão incompleta ou pirólise de material orgânico proveniente de fontes naturais ou antropogénicas.^[7]

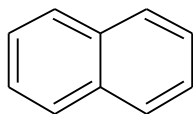
Os HAP têm baixa volatilidade e pouca solubilidade em água, apresentando coeficientes de partição octanol/água ($\log K_{ow}$) entre 3 a 7, demonstrando grande afinidade lipofílica, que em geral aumenta com a massa molecular. São sólidos à temperatura ambiente e apresentam elevados pontos fusão e ebulição. Embora quimicamente inertes, os HAP têm capacidade de se ligar às partículas presentes nas poeiras. Estas propriedades físico-químicas controlam o transporte, a distribuição e a deposição dos HAP no meio ambiente, nomeadamente no solo, no ar e na água.^[8]

Os HAP podem ser divididos em dois grupos quanto ao número de anéis aromáticos na sua estrutura: os de elevado peso molecular, se possuírem quatro ou mais anéis aromáticos e os de baixo peso molecular, se possuírem menos de quatro anéis aromáticos. A maioria dos HAP apresenta fluorescência, emitindo radiação num comprimento de onda característico quando as moléculas são excitadas. Alguns HAP também possuem um espectro de absorvância UV característico associado ao respetivo sistema aromático, sendo estas propriedades especialmente importantes na identificação destes compostos.^[9,10]

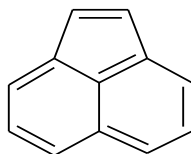
Devido à ubiquidade no meio ambiente e aos possíveis efeitos tóxicos na saúde humana, estes compostos têm sido estudados ao longo dos anos e identificados pelas agências governamentais. Em 1976, a US EPA (*United States – Environmental Protection Agency*) definiu uma lista de dezasseis HAP como poluentes prioritários, com base nos estudos de ocorrência na natureza, toxicidade e no seu potencial de exposição humana: naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[g,h,i]perileno e indenol[1,2,3-cd]pireno.^[11]

Em 1987, a Agência Internacional para a Pesquisa no Cancro (IARC – *Internacional Agency for Research on Cancer*) considerou o benzo[a]pireno carcinogénico e potencialmente genotóxico para o ser humano, sendo por isso usado com frequência como marcador de ocorrência dos HAP no controlo da qualidade dos alimentos e do ar.^[12]

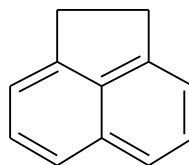
A Figura 1.4 apresenta as estruturas químicas dos dezasseis HAP considerados poluentes prioritários pela US EPA e na Tabela 1.1 estão indicadas as principais propriedades físico-químicas desses mesmos compostos.



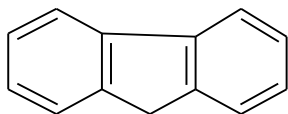
Naftaleno



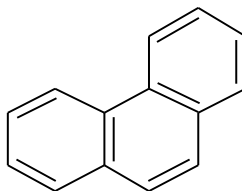
Acenaftileno



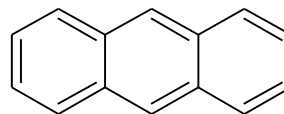
Acenafteno



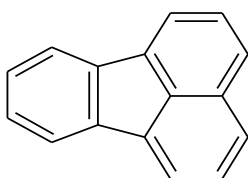
Fluoreno



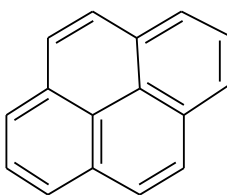
Fenantreno



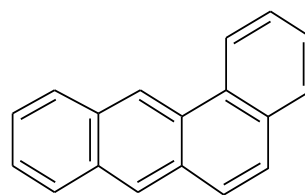
Antraceno



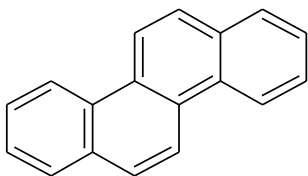
Fluoranteno



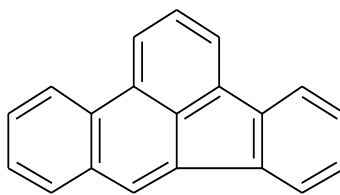
Pireno



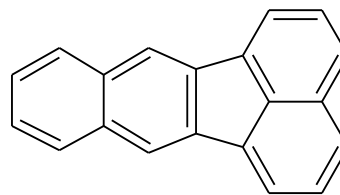
Benzo[a]antraceno



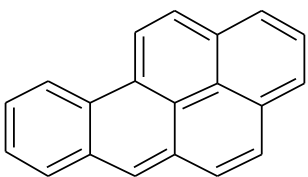
Criseno



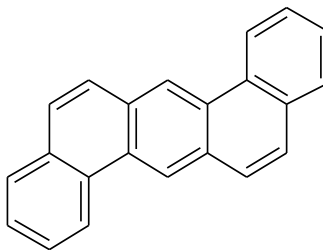
Benzo[b]fluoranteno



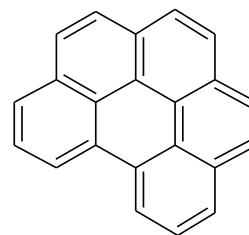
Benzo[k]fluoranteno



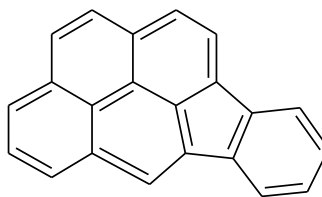
Benzo[a]pireno



Dibenzo[a,h]antraceno



Benzo[g,h,i]perileno



Indeno[1,2,3-cd]pireno

Figura 1.4 - Estrutura química dos 16 HAP considerados poluentes prioritários pela US EPA ^[13]

Tabela 1.1 - Propriedades físico-químicas dos 16 HAP prioritários pela US EPA ^[14]

Nome da Substância	Acrônimo	Fórmula Molecular	Massa Molar (g/mol)	Ponto de fusão (°C)	Ponto de ebulição (°C)	Log K _{ow}	Pressão de vapor a 25 °C (Pa)	Solubilidade em água a 25 °C (µg/L)
Naftaleno	Naf	C ₁₀ H ₈	128,1	80,5	218	3,40	10,4	3,17 × 10 ⁴
Acenaftileno	Acenf	C ₁₂ H ₈	152,2	92-93	280	4,07	8,9 × 10 ⁻¹	3,93 × 10 ³
Acenafteno	Acen	C ₁₂ H ₁₀	154,2	95	279	3,92	2,9 × 10 ⁻¹	3,4 × 10 ³
Fluoreno	Flu	C ₁₃ H ₁₀	166,2	115-116	295	4,18	8,0 × 10 ⁻²	1,98 × 10 ³
Fenantreno	Fen	C ₁₄ H ₁₀	178,2	100,5	340	4,60	1,6 × 10 ⁻²	1,29 × 10 ³
Antraceno	Ant	C ₁₄ H ₁₀	178,2	216,4	342	4,50	8,0 × 10 ⁻⁴	73
Fluoranteno	Flr	C ₁₆ H ₁₀	202,3	108,8	375	5,22	1,2 × 10 ⁻³	260
Pireno	Pir	C ₁₆ H ₁₀	202,3	150,4	393	5,18	6,0 × 10 ⁻⁴	135
Benzo[a]antraceno	BaA	C ₁₈ H ₁₂	228,3	160,7	400	5,61	2,8 × 10 ⁻⁵	14
Criseno	Cri	C ₁₈ H ₁₂	228,3	253,8	448	5,91	8,4 × 10 ⁻⁵	2,0
Benzo[b]fluoranteno	BbF	C ₂₀ H ₁₂	252,3	168,3	481	5,80	-----	1,2
Benzo[k]fluoranteno	BkF	C ₂₀ H ₁₂	252,3	215,7	480	6,84	1,3 × 10 ⁻⁷	0,76
Benzo[a]pireno	BaP	C ₂₀ H ₁₂	252,3	178,1	496	6,50	7,3 × 10 ⁻⁷	3,8
Dibenzeno[a,h]antraceno	DahA	C ₂₂ H ₁₄	278,4	266,6	524	6,50	1,3 × 10 ⁻⁸ (20 °C)	0,5 (27 °C)
Benzo[g,h,i]perileno	BghiP	C ₂₂ H ₁₂	276,3	277	545	7,10	1,4 × 10 ⁻⁸	0,26
Indeno[1,2,3-cd]pireno	Ind	C ₂₂ H ₁₂	276,3	163,7	536	6,58	1,3 × 10 ⁻⁸ (20 °C)	62

Os fogos florestais e a atividade vulcânica são as principais fontes naturais de HAP. Quanto às origens antropogênicas destaca-se a emissão de poeiras provenientes das indústrias de produção de coque, a produção de energia e calor (queima de madeira, óleos e combustíveis fósseis), a incineração e a emissão de gases pelos veículos motorizados. A elevada dispersão destes compostos resultante da sua adsorção às partículas que circulam no ar e a sua persistência no ambiente são condições que permitem a presença de HAP em zonas remotas do globo.^[15]

Embora sejam considerados poluentes ambientais, os HAP também têm valor comercial. Alguns destes compostos são utilizados na produção de pesticidas, de termoplásticos, de produtos fotográficos e de materiais lubrificantes. São também usados como intermediários na indústria química e farmacêutica e fazem parte da constituição do asfalto usado na construção de estradas. Existem várias utilizações industriais dos HAP, nomeadamente:

- Acenafteno: produção de pigmentos, corantes, plásticos e pesticidas
- Antraceno: diluentes e conservantes para madeiras
- Fluoranteno: produtos agroquímicos
- Fenantreno: produção de resinas e pesticidas
- Pireno: produção de pigmentos.^[16]

1.3.2. Metabolismo e Toxicidade

Os HAP são compostos relativamente não reativos com as macromoléculas biológicas em condições fisiológicas. Nos organismos vivos, os HAP só apresentam atividade tóxica após metabolização.^[7]

As vias de exposição incluem ingestão, inalação e contacto dérmico. As exposições a estes compostos podem envolver mais de uma via simultaneamente, afetando a dose total absorvida (como exposição dérmica direta e inalação de ar contaminado) e todas as fontes de exposição, como dieta, tabagismo e queima de carvão e madeira, devem ser levadas em consideração.^[15]

Uma vez no organismo, os HAP sofrem ativação metabólica por enzimas específicas, que catalisam a formação de metabolitos com grupos hidróxilo e epóxido, por meio de reações de oxidação. Estes intermediários quimicamente reativos induzem carcinogénese através da ligação covalente com as macromoléculas, como proteínas e DNA, formando aductos que são responsáveis por danos ao nível do crescimento e diferenciação celular, promovendo o desenvolvimento de tumores.^[7, 10, 17]

Na fase de ativação metabólica, os intermediários epóxidos são convertidos em compostos mais polares, nomeadamente fenóis e dióis, de forma a aumentar a sua solubilidade e facilidade de excreção pelo organismo através da urina e das fezes. Além disso, os metabolitos obtidos nas reações de oxidação são conjugados com a glutatona, que não tem capacidade de formar aductos com o DNA e induzir mutações.^[16,17]

Em 1775, o cirurgião inglês Percival Pott descreveu a elevada incidência de cancro no escroto dos limpadores de chaminés em Londres, sugerindo que este se desenvolvia em resultado da constante exposição às cinzas e à fuligem.^[15] Mais tarde foi relacionado o aparecimento de cancro com a exposição ocupacional dos HAP.

Na década de 1930, o benzo[a]pireno foi isolado do alcatrão, testado em animais de laboratório e concluiu-se ser carcinogénico após exposição dérmica.

Os estudos levados a cabo no final do século XX consolidaram a relação entre a exposição ocupacional a misturas de HAP e o aumento do risco de incidência do cancro. Os trabalhadores mais expostos às misturas de HAP são os das indústrias de:

- Produção de gás a partir do carvão,
- Produção de coque,
- Destilação do alcatrão,
- Produção de alumínio,
- Produção de eléctrodos de carbono,
- Produção de carboneto de cálcio e limpadores de chaminés ou trabalhadores expostos a outro tipo de fuligem.

Nos grupos de trabalhadores expostos aos HAP prevalece o cancro do pulmão e da pele relacionados com a via de exposição a que os trabalhadores estão sujeitos: inalação e dérmica, respetivamente. Há também registos de incidência de cancro no trato gastrointestinal. No entanto, este tipo de ocorrências pode estar associado não só à exposição de misturas de HAP mas também com a exposição de outros compostos, como aminas aromáticas.^[10]

Com base em todas as evidências registadas, a Agência Internacional para a Pesquisa do Cancro (IARC, *International Agency For Research on Cancer*), entidade da Organização Mundial de Saúde (OMS), definiu cinco grupos para classificar os HAP de acordo com o seu potencial efeito carcinogénico, os quais estão descritos na Tabela 1.2.

Tabela 1.2 - Classificação dos compostos químicos com potencial atividade carcinogénica^[18]

Grupo	Classificação
1	Carcinogénico para o homem
2A	Provável carcinogénico para o homem
2B	Possível carcinogénico para o homem
3	Não classificado quanto à sua carcinogenicidade para o homem
4	Provavelmente não carcinogénico para o homem

A Tabela 1.3 apresenta a classificação pela IARC dos 16 HAP considerados poluentes prioritários pela US EPA. O benzo[a]pireno é o único considerado carcinogénico para o homem, no entanto, alguns desses compostos têm provável e possivelmente o mesmo efeito.

Tabela 1.3 - Classificação dos 16 HAP poluentes prioritários pela IARC ^[18]

Nome da Substância	Classificação	Nome da Substância	Classificação
Naftaleno	2B	Benzo[a]antraceno	2A
Acenaftileno	-	Críseno	3
Acenafteno	3	Benzo[b]fluoranteno	2B
Fluoreno	3	Benzo[k]fluoranteno	2B
Fenantreno	3	Benzo[a]pireno	1
Antraceno	3	Dibenzo[a,h]antraceno	2A
Fluoranteno	3	Benzo[g,h,i]perileno	3
Pireno	3	Indeno[1,2,3-cd]pireno	2B

1.3.3. Distribuição no Ambiente e os Incêndios Florestais

Os principais poluentes orgânicos existentes no ambiente são os hidrocarbonetos alifáticos halogenados (alcanos e cicloalcanos), os hidrocarbonetos aromáticos monocíclicos (BTEx), os hidrocarbonetos alifáticos oxigenados (álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos e ésteres), os compostos fenólicos, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), os bifenilos policlorados (PCB), os compostos organoclorados (pesticidas), os fármacos e os retardantes de chamas. A origem dos poluentes orgânicos no solo e nas águas provém principalmente das atividades industriais (produção de energia, metalurgia, indústria química, etc.), urbanas (transportes, gestão e tratamentos de dejetos) e agrícolas (utilização de produtos fitossanitários). ^[19]

Os HAP distribuem-se maioritariamente na atmosfera, no entanto também existem na água, no solo e em sedimentos. Estes compostos são, em parte, removidos da atmosfera através do fenómeno da precipitação ou por deposição seca de partículas. Os HAP com maior massa molecular tendem a adsorver-se nas partículas, enquanto que os de menor massa molecular tendem a permanecer na fase gasosa até serem removidos por precipitação. ^[16]

As concentrações dos HAP na água são geralmente baixas devido à fraca solubilidade. No entanto, a baixa solubilidade destes compostos leva à acumulação em sedimentos e nos organismos aquáticos. ^[15]

Entre os vários impactos no ambiente causados pelos incêndios florestais, estes podem ser considerados como fonte de poluição difusa para os sistemas aquáticos que se encontrem a jusante de zonas ardidas, na medida em que são responsáveis pela produção e/ou remobilização de compostos com potencial tóxico, nomeadamente os HAP. A presença destes compostos na água é resultante não só da deposição atmosférica direta e da precipitação, mas também através do escoamento de águas da chuva em solos contaminados e de efluentes de águas residuais, que podem atingir os sistemas aquáticos, comprometendo a qualidade da água e afetando o biota aquático. ^[16,20]

Portugal é o país europeu com o maior número de ocorrências de incêndios e, segundo o ICNF (Instituto da Conservação e da Floresta) registou-se na última década uma média de 102 000

ha de área ardida por ano (2008-2017). Em Portugal, a área ardida compreende sobretudo povoamentos de eucalipto, pinheiro bravo e matos, correspondendo aos tipos de povoamentos florestais mais propensos aos incêndios. Neste contexto, e considerando os futuros cenários de alterações climáticas, os quais preveem uma maior duração da estação seca e o aumento das temperaturas de Verão extremas é de esperar que a ocorrência de incêndios florestais seja exacerbada com impactos a nível económico, social e ambiental. ^[20, 21]

A Covilhã foi um dos concelhos atingidos pelos fogos do Verão de 2017, onde foram queimados vários hectares de floresta e terrenos agrícolas em diferentes freguesias do concelho, incluindo na área da Serra da Estrela. A Câmara Municipal promoveu em Dezembro de 2017 duas ações de estabilização de emergência de solos em zonas afetadas por incêndios. Estas ações visavam reduzir a erosão e a velocidade das águas de escorrência, aumentar a taxa de infiltração e facilitar a retenção das cinzas através das técnicas de *mulching*, ou seja, à base de troncos, ramos, galhos e estilhas devidamente colocados no solo. ^[22]

Uma das formas de avaliar o impacto dos fogos florestais nos solos e nos recursos hídricos é através dos poluentes orgânicos. A determinação dos níveis desses poluentes pode indicar a importância relativa dos impactos nas áreas ardidas e a intensidade das atividades naturais e antrópicas numa região, tendo em vista que estão diretamente associados a fontes conhecidas de poluição. ^[19]

Deste modo, a pesquisa de HAP pode ser uma forma de analisar a qualidade da água, relacionando com as possíveis fontes emissoras e avaliando o seu impacto no meio ambiente.

1.4. Amostragem

Todos os tipos de água são suscetíveis de sofrer modificações, em maior ou menor escala, em consequência de fenômenos físicos, químicos ou biológicos, que podem ocorrer no período entre o momento em que é feita a colheita da amostra de água e o momento em que é desenvolvido o ensaio no laboratório.

Estas modificações estão associadas à natureza química e biológica da amostra, à eventual exposição das amostras à luz, à natureza do recipiente de colheita, à temperatura, e poderão condicionar os resultados analíticos finais bem como a sua interpretação. Deste modo, a amostragem pontual ou tradicional de água é realizada em frasco de recolha em vidro âmbar inerte para análise de compostos orgânicos. A colheita e as técnicas de preservação, transporte e manipulação de amostras de água para ensaio são, assim, operações que envolvem cuidados especiais por forma a minimizar estas alterações.

A partir de amostragem pontual são obtidos resultados de qualidade, no entanto essa informação é referente apenas à concentração dos contaminantes no momento da amostragem e não tem em conta eventuais episódios de contaminação. Nesses casos, a abordagem comum é através da colheita de várias amostras representativas, ao longo de um período de tempo, o que implica um aumento de tempo, recursos e custo de análise.

A amostragem passiva permite obter a concentração média de um poluente ao longo de um período de tempo, minimizando o erro associado a variações de concentração a curto prazo.^[23]

1.4.1. Amostragem Passiva

A amostragem passiva, com recurso ao uso de dispositivos, começou a ser desenvolvida na década de 1970, sendo inicialmente direcionada para a análise e quantificação de poluentes atmosféricos, como NO₂ e SO₂. Os primeiros estudos que descrevem o uso de amostradores em ambientes aquáticos foram publicados nos anos 80, sendo que só anos mais tarde surgiram amostradores para a análise no solo e em sedimentos.^[24,25]

Byrne e Aylott, em 1980, foram os primeiros a patentear um dispositivo simples que permitia a amostragem de contaminantes orgânicos na água. O dispositivo consistia num reservatório com um solvente orgânico apolar separado da água por membranas poliméricas não porosas.

Atualmente, existem vários amostradores no mercado que permitem a triagem, quantificação e monitorização de contaminantes orgânicos e inorgânicos em diferentes matrizes ambientais. A maioria é constituída por uma barreira e uma fase recetora com elevada afinidade para os poluentes de interesse. No caso dos amostradores passivos para as análises de água, as barreiras são geralmente membranas poliméricas, como polietileno, celulose, cloreto de polivinilo, nylon, polipropileno,

dimetilpolisiloxano e politetrafluoroetileno. As membranas poliméricas formam uma barreira física que impedem a difusão das moléculas de águas para a fase recetora. [26]

A amostragem passiva é uma técnica que se baseia no fluxo livre das moléculas do analito da matriz para uma fase recetora contida no dispositivo, como resultado da diferença entre o potencial químico dos analitos nos dois meios. A fase recetora pode ser um solvente, uma resina polimérica ou um adsorvente poroso. Este processo ocorre segundo as leis de Fick, em que a difusão por gradiente é determinante na recolha dos poluentes pelo dispositivo, durante um período de exposição de dias ou semanas no meio ambiente. Após esse período de tempo, em laboratório são realizadas técnicas de extração e métodos de análise de modo a determinar a concentração dos analitos nos amostradores. [26-28]

A escolha do amostrador adequado depende de vários fatores que influenciam a captação dos analitos, nomeadamente o meio da amostragem, ou matriz (ar, água, sedimentos), as propriedades físicas e químicas dos analitos, a configuração do amostrador, o tempo de exposição, o custo e disponibilidade e as variáveis ambientais. [26]

Dependendo do tipo de barreira, da fase recetora, da configuração do dispositivo e do tempo de amostragem, os amostradores passivos podem funcionar em fase cinética ou em fase de equilíbrio. A Figura 1.5 mostra as fases de funcionamento dos amostradores passivos na captação dos analitos.

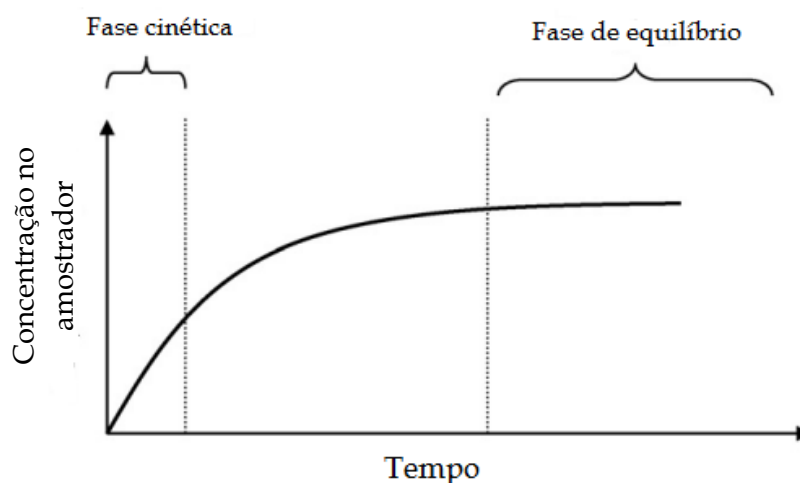


Figura 1.5 - Fases de captação dos analitos pelos amostradores passivos. (Adaptado de [26])

De acordo com este modelo, a captação pelo amostrador ocorre até que o potencial químico dos analitos na fase recetora e na matriz seja o mesmo. Inicialmente, na fase cinética, o adsorvente atua como um “poço infinito” para os contaminantes, sendo que a taxa de dessorção dos analitos da fase recetora para a água é desprezável. Nestas condições, a transferência de massa do poluente está linearmente relacionada com a concentração na água. Esta fase dura até que ocorra aproximadamente

a metade da saturação da fase recetora. À medida que o tempo de exposição aumenta, a concentração aproxima-se da fase de equilíbrio, em que a taxa de adsorção e dessorção dos analitos é igual. ^[29,30]

Deste modo, os amostradores passivos podem ser divididos em dois tipos: amostradores de equilíbrio e amostradores de não-equilíbrio. Nos amostradores de equilíbrio, o tempo de exposição é suficientemente longo para permitir que seja atingido o equilíbrio termodinâmico entre a água e a fase recetora. No entanto pode acontecer o retorno dos analitos para a água, caso ocorra diminuição da concentração na matriz. ^[27]

Os amostradores de não-equilíbrio, também conhecidos como dispositivos de amostragem cinética ou integrativa, caracterizam-se por não atingir o equilíbrio entre o meio de amostragem e a fase recetora. Assim, estes amostradores têm uma grande capacidade de recolher os analitos de interesse durante o período de amostragem. A vantagem destes amostradores é que podem ser usados onde a concentração de contaminantes é variável, bem como na captação de analitos oriundos de eventos pontuais e em pequenas quantidades, o que geralmente não é detetado pela amostragem tradicional. ^[25, 27]

As propriedades físicas e químicas dos analitos também interferem na capacidade de adsorção dos amostradores. É possível que os dispositivos possam estar em equilíbrio para alguns contaminantes durante a amostragem e não estejam em equilíbrio para outros compostos. ^[25]

O equipamento utilizado na amostragem passiva é pequeno, leve, simples e de fácil manuseamento, o que facilita a amostragem e os procedimentos laboratoriais. Os dispositivos devem ser insensíveis a interferentes e, sobretudo, sensíveis aos analitos de interesse. Outras vantagens incluem a redução do número de colheitas de amostras para análise, diminuindo o custo final dos programas de monitorização da qualidade da água, e ainda reduz a alteração da amostra pelo transporte e armazenamento. ^[31]

Na Figura 1.6 encontram-se representados três exemplos de amostradores passivos usados em análises ambientais em águas. Na Tabela 1.4 estão referenciadas as respetivas características desses amostradores.

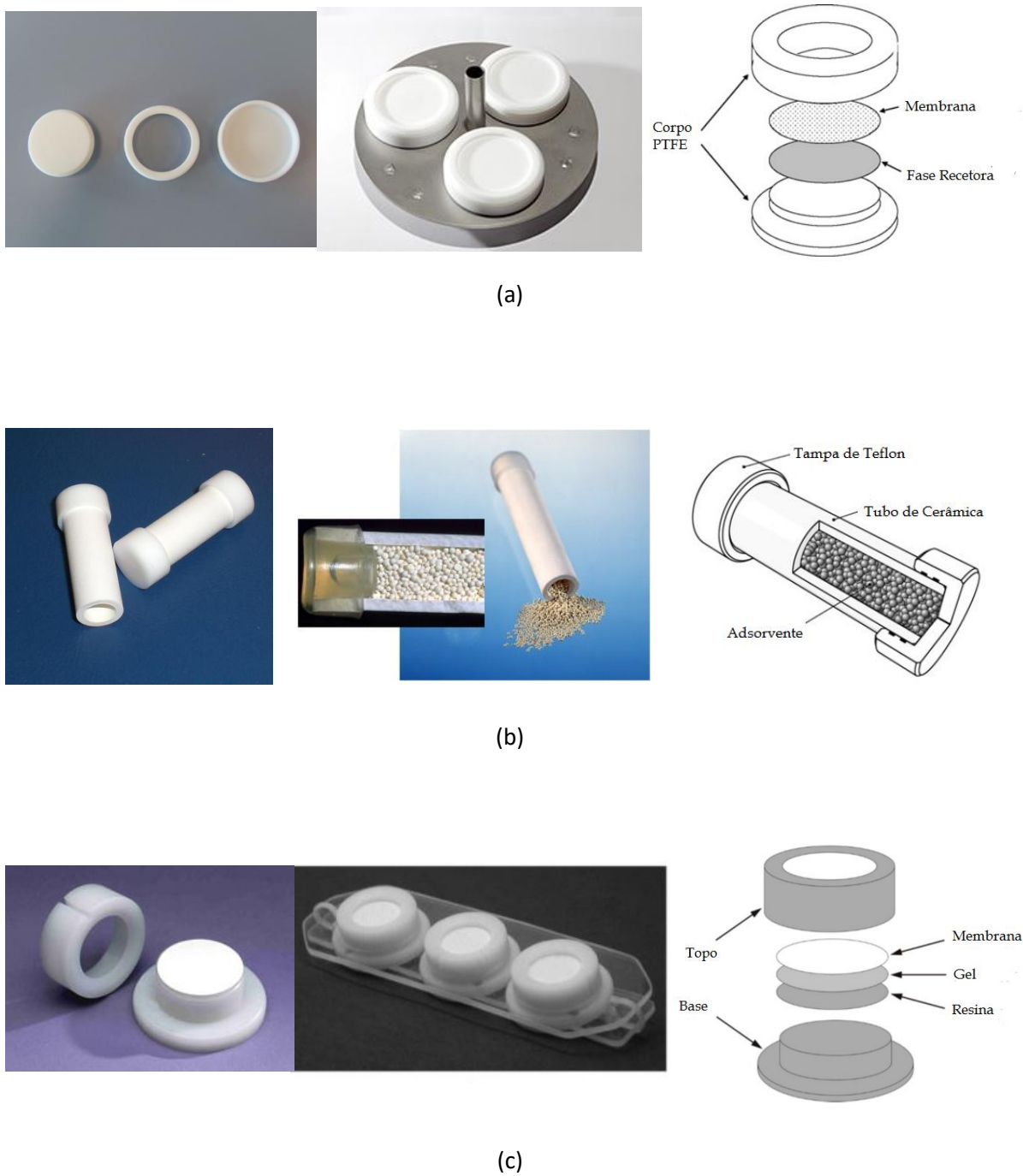


Figura 1.6 - Configuração de alguns dispositivos usados na análise de águas: (a) *Chemcatcher*, (b) Dosímetro Cerâmico, (c) DGT - *Diffusion gradient in thin-film* [25, 32,33]

Tabela 1.4 - Características dos amostradores passivos ^[34]

Amostrador	Configuração	Regime de funcionamento	Analitos	Tempo de Exposição	Vantagens	Desvantagens	Preparação das amostras
<i>Chemcatcher</i>	Disco com fase recetora e disco de membrana de difusão	Cinético	Orgânicos polares e apolares Cd, Cu, Ni, Pb e Zn	14 dias a 1 mês	Seletividade da amostra pode ser ajustada através de membrana de discos	Precisão	Extração ácida
Dosímetro Cerâmico	Tubo de cerâmica preenchido com fase sólida	Cinético	HAP, BTEX, Hidrocarbonetos clorados	1 ano	Não necessita de calibração, bom para monitorização durante longos períodos	Pouco sensível	Extração por solvente ou dessorção térmica
DGT	Camada de gel de acrilamida entre a fase recetora e a membrana	Cinético	55 elementos metálicos, P, S ²⁻ e ⁹⁹ Tc	48 h - 1 semana	Versátil, bem documentado	Preparação complexa do dispositivo	Extração ácida

1.4.1.1. SPMD

O dispositivo de membranas semipermeáveis, SPMD (*Semipermeable membrane Devices*) foi desenvolvido por *Hunckins* em 1990, como indicador da biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos. Este dispositivo reproduz a capacidade de adsorção de contaminantes pelas células membranares dos organismos aquáticos, o que permite avaliar a bioacumulação de poluentes presentes na água. ^[35]

O SPMD (Figura 1.7) é um dispositivo de amostragem integrativa constituído por uma membrana de polietileno de baixa densidade (LDPE), com cerca de 90 cm de comprimento, 2,5 cm de largura e 75-90 μm de espessura. O interior da membrana é constituído por 1 mL de trioleína (1,2,3-tri-cis-9-octadecenoil glicerol), um lípido apolar, de elevada pureza (> 95%). A membrana tem uma área superficial de 460 cm^2/mL de trioleína e a massa do SMPD é de aproximadamente 4,6 g. ^[36]



Figura 1.7- Amostrador SPMD no suporte metálico

A membrana de LDPE é um material não poroso que possui cavidades com um tamanho típico de 1 nm, que permite excluir moléculas com dimensões superiores (Figura 1.8). Apenas compostos hidrofóbicos neutros com massa molecular < 600 Da são concentrados no SPMD.

Numa primeira aproximação, de um ponto de vista mecânico, os compostos apolares aproximam-se da membrana de LDPE, dissolvem-se na membrana, difundem-se para o seu interior e finalmente dissolvem-se na fase recetora, a trioleína. ^[37]

Apesar de outros lípidos e fluidos terem sido utilizados como fases recetoras, a trioleína foi escolhida como padrão no SMPD por ser um triglicérido neutro presente na constituição membranar da maioria dos organismos aquáticos, por ter uma elevada massa molecular (885,5 Da) que resulta na reduzida permeabilidade com a membrana de LDPE, por ter elevada pureza na sua forma sintética

comercialmente disponível e, sendo um líquido apolar, tem uma baixa tensão interfacial com o LDPE e os coeficientes de difusão dos solutos são maiores que nas fases sólidas, o que assegura uma rápida acumulação dos contaminantes. ^[38]

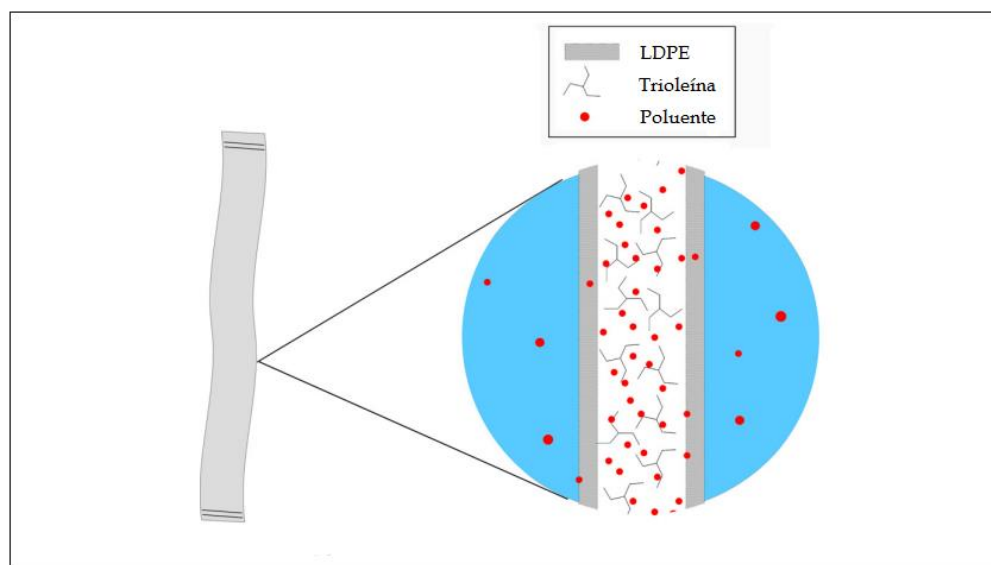


Figura 1.8 - Configuração do SPMD e exclusão molecular dos poluentes pela membrana (Adaptado de [38])

A amostragem do SPMD é influenciada não só pelas propriedades físico-químicas dos poluentes (dimensão, polaridade, ionização), como pelas variáveis ambientais, nomeadamente as condições hidrodinâmicas (velocidade, turbulência), a temperatura, a salinidade e a deposição e crescimento de microrganismos no dispositivo. ^[23]

A capacidade de acumulação de compostos apolares pelo amostrador está diretamente relacionada com o coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$). Compostos com valores de K_{ow} elevados têm maior possibilidade de serem concentrados no dispositivo. O SPMD apresenta elevada sensibilidade para compostos com $\log K_{ow} \geq 3$ ^[36]. Na Tabela 1.5 estão listados alguns dos compostos comuns detetados por este amostrador e exemplos das respetivas fontes possíveis de contaminação

Tabela 1.5 - Compostos comuns detetados pelo SPMD ^[36]

Compostos detetados pelo SPMD	Possíveis Fontes
Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP)	Produto de combustão
Bifenilos Policlorados (PCB)	Industrial e elétrica
Compostos Organoclorados	Pesticidas
Piretróides	Inseticidas
Dioxinas	Combustão, Industrial
Furanos	Subproduto industrial
Nonilfenóis	Industrial
Óleos C ₈ -C ₃₆	Industrial, combustíveis fósseis
Tributilestanhos (TBT)	Navios

Devido à natureza integrativa do processo de amostragem, os dispositivos podem ser expostos em intervalos de dias ou meses, dependendo dos níveis esperados de concentração dos analitos. Geralmente, o período de amostragem suficiente para obter níveis quantificáveis da maioria dos contaminantes hidrofóbicos relevantes varia entre 14 a 30 dias.

Os amostradores SPMD devem ser acondicionados em recipientes apropriados antes e após a recolha no terreno, sendo que as amostras devem ser armazenadas a temperaturas baixas, idealmente a - 15 °C para a preservação dos analitos até o momento da análise. O contacto do amostrador com ar também deve ser evitado, uma vez que pode ocorrer contaminação por compostos voláteis. Desta forma, os técnicos que os manuseiam devem evitar o uso de loções, perfumes ou outros cosméticos que possam ser concentrados no dispositivo. É importante também ter em conta o acondicionamento e transporte antes e após a exposição, a seleção do local para a amostragem, a instalação do dispositivo, a recolha das amostras e os procedimentos laboratoriais. ^[37]

O processamento das amostras para extração dos analitos envolve a limpeza da superfície do SPMD, extração, purificação dos extratos obtidos e análise.

O método de extração mais utilizado na recuperação dos compostos orgânicos é a diálise. Os procedimentos deste método descritos na literatura envolvem a utilização de 100 a 900 mL de solvente, geralmente hexano, durante 24 a 48 h. Outros métodos alternativos têm surgido de modo a reduzir o tempo de extração e a quantidade de solvente utilizado, como por exemplo a extração assistida por micro-ondas (MAE), extração acelerada por solvente (ASE) e a extração assistida por ultrassons (UAE). ^[39] A Tabela 1.6 compara os diferentes métodos de extração na recuperação dos HAP do SPMD em ensaios de fortificação.

Tabela 1.6 - Comparação dos métodos de extração na recuperação de HAP do SPMD

Método	Refs.	Volume de solvente	Tempo de Extração	Recuperação (%)	RSD (%) ^a	Vantagens	Desvantagens
Diálise	[40]	2 x 130 mL (hexano)	2 x 24h	70 - 137 (5 HAP)	8,5 - 20,2	Fácil, Não é necessário instrumentação	Lento, elevado consumo de solvente
	[41]	500 mL (ciclopentano)	24h	43 - 108 (16 HAP)	5 - 13		
	[42]	75 (hexano)	48 h	21 - 109 (16 HAP)	< 20		
MAE	[39]	33 mL (tolueno - água 10:1)	3 x 3 min	87- 104 (16 HAP) ^b	-----	Rápido, pouco consumo de solvente	Instabilidade dos analitos, risco de destruição do dispositivo
ASE	[40]	Hexano – acetona (90:10)	4 x 10 min	89 – 123 (5 HAP)	11,2 – 18,9	Rápido, pouco consumo de solvente	Instrumentação específica
UAE	[43]	80 mL (hexano)	32 min	82 – 109 (16 HAP)	2 - 13	Rápido, fácil	Elevada manipulação da amostra, fácil contaminação

^a Desvio padrão relativo, ^b os valores são correspondentes à razão entre as recuperações obtidas por diálise com as obtidas por MAE

1.4.1.2. POCIS

O Amostrador integrativo de compostos orgânicos polares, POCIS (*Polar Organic Chemical Integrative Sampler*), foi concebido para complementar as aplicações do SPMD e é usado na monitorização de compostos orgânicos com $\log K_{ow} < 3 - 4$ em ambientes aquáticos. O amostrador permite determinar concentrações médias de poluentes em água durante períodos extensos (várias semanas).^[26]

O POCIS (Figura 1.9) é constituído por uma fase sólida adsorvente entre duas membranas microporosas de poliétersulfona presas por anéis metálicos. As membranas microporosas funcionam como barreiras semipermeáveis entre a fase recetora (adsorvente) e o meio ambiente. Os poros da membrana (tamanho de 100 nm) excluem partículas, colóides e microrganismos e permitem a passagem dos analitos de interesse.^[23,44]

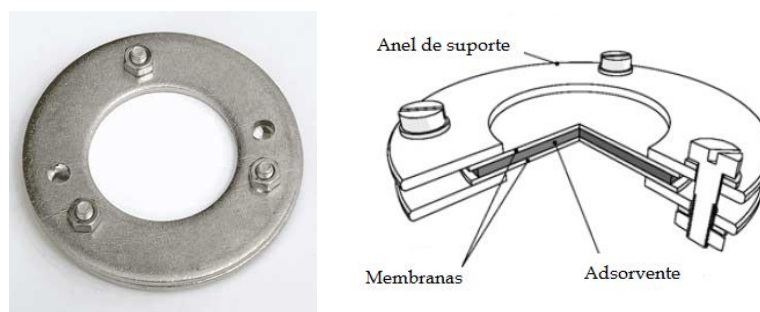


Figura 1.9 - Configuração do POCIS^[25]

Dependendo do tipo de adsorvente, os amostradores podem ter diferentes configurações, o que permite a monitorização de compostos específicos e de determinadas classes de poluentes. As mais utilizadas e comercialmente disponíveis são a configuração genérica, POCIS Pesticidas, formada por uma fase recetora sólida composta por uma mistura trifásica de uma resina de poliestireno-divinilbenzeno hidroxilado (*Isolute ENV*), um adsorvente à base de carbono (*Ambersorb 1500*) e um copolímero poroso de estireno-divinilbenzeno (*S-X3 Bio-Beds*). A configuração farmacêutica, POCIS Fármacos, é constituída por uma fase recetora designada por *OASIS HLB*, um copolímero hidrofílico-lipofílico formado por uma mistura de compostos N-vinilpirrolidona e divinilbenzeno.^[26, 34]

O POCIS é também usado na monitorização de outros contaminantes hidrofílicos, como herbicidas, drogas, hormonas, antibióticos, produtos de cuidado pessoal, entre outros. Na Tabela 1.7 encontram-se alguns exemplos de compostos que podem ser detetados por este dispositivo.

Tabela 1.7 - Compostos detetados pelo POCIS ^[45]

Classe dos compostos	Exemplos
Fármacos	Acetaminofeno, Azitromicina, Carbamazepina, Propanolol, Tetraciclina (antibióticos)
Drogas ilícitas	Metanfetamina, MDMA
Hormonas naturais e sintéticas	17 β - Estradiol, Estrona, Estriol, 17 α – Etinilestradiol
Herbicidas	Atrazina, Cianazina, Terbutilazina
Pesticidas Polares	Alaclor, Clorpirifos, Diazinão, Diclorvos, Diurão, Isoproturão, Metolacoloro
Produtos domésticos, industriais e produtos de degradação	Alquilfenóis (nonilfenóis), Benzofenona, Cafeína, DEET, Indol, Triclosan
Urobilinogénio (marcador contaminação fecal)	

Mais de 300 compostos foram detetados e quantificados por este amostrador. Muitos deles apresentam um coeficiente de partição octanol - água superior a 4, pelo que este parâmetro não é fixo, demonstrando que a validação do POCIS requer uma investigação mais aprofundada. ^[44]

A extração do amostrador POCIS - Pesticidas é geralmente realizada com uma mistura de metanol: tolueno: diclorometano (1:1:8), enquanto que a configuração Fármacos é efetuada com metanol. Dependendo do tipo de moléculas em estudo, podem ser realizadas extrações com outros solventes. ^[46-48]

Os amostradores passivos possuem várias vantagens: não exigem a recolha e o transporte de grandes quantidades de frascos com água a analisar para o laboratório, diminuem o risco de contaminação da amostra ou perda dos analitos por adsorção, degradação ou volatilização, reduz os custos de amostragem, sendo um único dispositivo capaz de recolher informação de uma grande área, requerem poucas análises – evitam gastos processos de tratamento de amostra e de recursos energéticos. ^[49]

Neste trabalho foram utilizados o modelo EWL (*Exposmeter Water Lipophilic*) do amostrador SPMD e o modelo EWH (*Exposmeter Water Hydrophilic*) do POCIS nas duas configurações, da empresa ExposMeter AB.

1.5. Metodologia Analítica

A química analítica é uma área muito abrangente que envolve a análise de diferentes matrizes (ambientais, alimentares, biológicas, entre outras), em diferentes estados de matéria, com o objetivo de obter informações sobre os seus constituintes, nomeadamente, a composição química, a estrutura (arranjo espacial dos átomos e moléculas), a quantidade (concentração), a distribuição (homogeneidade) e propriedades de superfície. ^[50,51]

Os métodos analíticos são todos os processos químicos, físicos e radiométricos que podem ser utilizados em laboratório para a obtenção de um resultado analítico qualitativo e/ou quantitativo, e incluem processos de preparação de amostra, técnicas de separação e cálculos analíticos. ^[52]

A escolha do método analítico deve ser feita tendo em conta os seguintes fatores ^[53]:

- Características da matriz e do analito
- Parâmetros de qualidade (seletividade, gama de trabalho, sensibilidade, precisão, veracidade, exatidão, robustez)
- Tempo de análise
- Programa de amostragem
- Disponibilidade do equipamento
- Custo económico associado a todo o processo

Ao longo dos anos, com o desenvolvimento tecnológico, a instrumentação analítica foi aperfeiçoada permitindo o aumento da sensibilidade (limites de deteção e quantificação mais baixos), da precisão e da exatidão.

No âmbito desta tese, foi desenvolvido um método analítico para a determinação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e compostos desconhecidos através da amostragem passiva. Na Figura 1.10 estão representadas as principais etapas do processo.

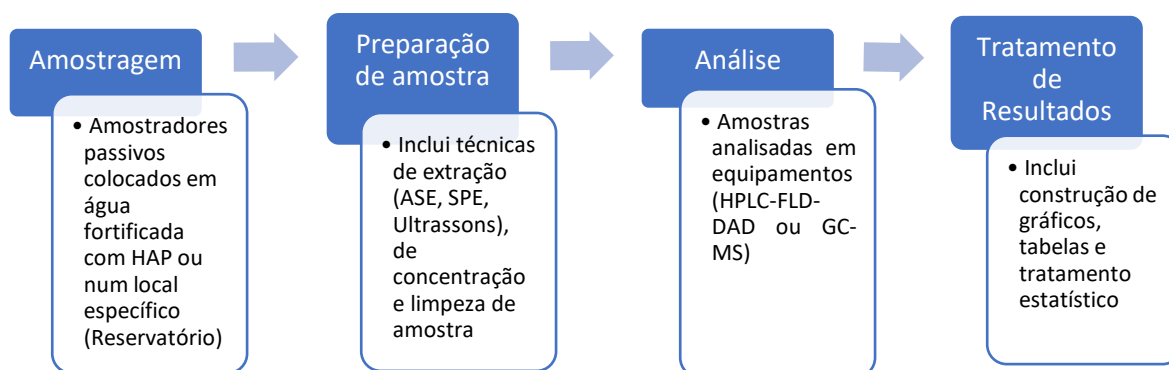


Figura 1.10 - Etapas principais do método analítico: caso de estudo

1.5.1. Técnicas de Preparação da amostra

A preparação de amostras é um passo crítico na análise de amostras ambientais e biológicas. Cerca de 80% do tempo de análise total corresponde à transformação da amostra de forma a torná-la analisável. Em química analítica, uma parte importante da preparação da amostra é a extração quantitativa dos compostos de interesse (analitos) dos restantes componentes da amostra (a matriz) que podem interferir com a análise instrumental. Assim, a escolha da técnica de extração adequada deve ter em conta, não só as características da matriz (gasosa, líquida ou sólida), como dos seguintes fatores: características da matriz e do analito, tempo de extração, recuperação do analito extraído, simplicidade do procedimento, envolvimento e manipulação do operador e custos de instalação e operação. ^[54]

No âmbito desta tese, a extração assistida por ultrassons foi a técnica selecionada e desenvolvida para a extração de HAP dos amostradores passivos. Paralelamente, foi estudada a extração acelerada por solvente na extração dos mesmos compostos e ainda foi comparada a técnica da extração em fase sólida, atualmente já implementada e utilizada nos ensaios de rotina da EPAL.

1.5.1.2. Extração Assistida por Ultrassons

Os ultrassons são atualmente utilizados em diferentes áreas, por exemplo, na medicina, indústria química, alimentar e farmacêutica, e podem ser aplicados como alternativas a algumas técnicas tradicionais de processamento, como emulsificação, homogeneização, esterilização, desgaseificação ou técnicas convencionais de extração devido à sua eficiência, baixo consumo de energia e tempo.

Os ultrassons são ondas mecânicas acústicas, que necessitam de um meio para se propagarem e possuem uma frequência acima do limite de audição humana (> 20 kHz). Podem ser aplicados em líquidos ou semissólidos e dependendo do estado físico, as ondas podem ser propagadas por uma sonda, no caso dos líquidos, ou através da imersão de um sólido em banhos de ultrassons. ^[55]

Os uso dos ultrassons causam mudanças físicas e químicas devido à variação de pressão nos sistemas líquidos, pela alternância de compressão (pressão positiva) e rarefação (pressão negativa) nas ondas, gerando fenómenos como a cavitação (crescimento aparente e colapso de bolhas dentro do líquido, que se expandem durante a pressão negativa e implodem violentamente, formando ondas de elevada energia e turbulência), microfluxos nos líquidos, aquecimento e instabilidade na superfície de interface de sistemas sólido-líquido. ^[56,57]

O mecanismo de processo de extração por ultrassons é atribuído ao fenómeno da cavitação, que induz ruturas nos sólidos e aumenta a permeabilidade dos materiais, facilitando a penetração do solvente nas áreas mais internas. A turbulência gerada pela transmissão acústica aumenta significativamente os coeficientes de transferência de massa e a extração dos constituintes solúveis para o solvente. ^[57]

O tipo, a concentração e a quantidade de solvente têm um efeito proeminente na eficácia da extração. A extração assistida por ultrassons depende da capacidade do solvente em absorver e transmitir a energia das ondas de ultrassom. A cavitação é afetada pelas propriedades físicas do solvente, nomeadamente a tensão superficial, viscosidade, e a pressão de vapor e geralmente a intensidade da cavitação diminui à medida que a pressão de vapor e a tensão superficial aumentam.

[57]

1.5.1.2. Extração em Fase Sólida

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica usada para a remoção de interferentes e para a concentração e isolamento dos analitos de uma matriz líquida através da sua transferência para uma fase sólida. [58]

As fases sólidas ou adsorventes estão disponíveis em vários formatos: contidos em cartuchos, em colunas semelhantes a seringas ou em discos. Os adsorventes típicos são à base de sílica funcionalizada ou polímeros, no entanto também têm sido explorados outros materiais, como os nanotubos de carbono, bioadsorventes e nanopartículas. [59]

A SPE surgiu como alternativa à extração líquido-líquido na eliminação de problemas associados a essa técnica, tais como, separações incompletas de fase, formação de emulsões e consumo de grandes quantidades de solventes orgânicos. Para além disso, a SPE oferece como vantagens a rapidez, fácil manipulação, elevado fator de concentração, facilmente adaptável para extrações muito seletivas, compatibilidade com qualquer tipo de análise instrumental e automatização. [59,60]

No entanto, como qualquer outra técnica, a SPE também apresenta desvantagens. Entre elas é possível destacar a baixa recuperação resultante da interação entre a matriz aquosa e os analitos, eluição incompleta, entupimento dos cartuchos ou bloqueamento dos poros do adsorvente por componentes sólidos. [61]

Os cartuchos que contém a fase sólida são a forma mais comum e a mais utilizada, sendo constituídos por um tubo de polipropileno contendo cerca de 50 a 500 mg de adsorvente, com 40 a 60 µm de tamanho de partícula, fixado no tubo por meio de dois filtros de tamanho de poros de 20 µm. [62]

Um procedimento de SPE envolve, geralmente, quatro passos: o condicionamento do adsorvente, a introdução da amostra, a lavagem e a eluição dos analitos (Figura 1.11)

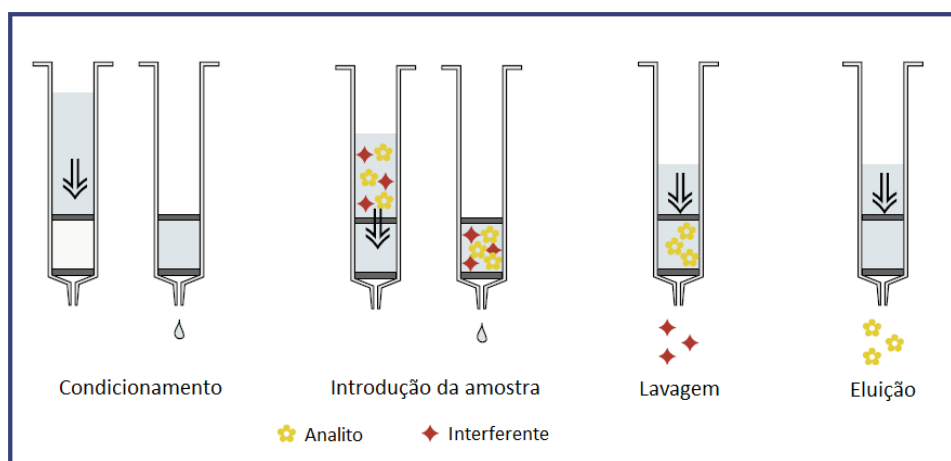


Figura 1.11 - Etapas envolvidas na SPE (Adaptado de [63])

Antes de iniciar a extração dos analitos, a base do adsorvente deve ser preparada de modo a que a sua superfície fique efetivamente em contacto com a amostra líquida. O passo de condicionamento é normalmente acompanhado pela passagem de um pequeno volume de solvente orgânico, como o metanol ou acetonitrilo, através do cartucho de extração. Algum deste solvente orgânico é adsorvido na superfície das partículas do adsorvente, tornando a superfície mais hidrofílica e mais compatível com a solução aquosa. O passo de condicionamento, para além de proporcionar um ambiente adequado para a adsorção do analito, também permite a remoção de impurezas e contaminantes que podem interferir com a análise.

A amostra é introduzida na coluna com aplicação de pressão ou aspiração por vácuo. A retenção do analito depende da sua natureza química, do tipo de solvente e das características do adsorvente utilizado.

O passo da lavagem tem como objetivo a remoção de impurezas tão completa quanto possível, com um solvente apropriado. Geralmente, a solução para a remoção dos interferentes contém menor percentagem de solvente orgânico, suficiente para não eluir os analitos.

O último passo é a eluição, o processo pelo qual os analitos são removidos do adsorvente onde estão retidos, utilizando-se um solvente que tenha afinidade para os analitos. ^[59-62]

1.5.1.3. Extração Acelerada por Solvente

A Extração Acelerada por Solvente (ASE) é uma técnica de preparação de amostra usada na extração de compostos orgânicos de matrizes sólidas e semi-sólidas, utilizando solventes líquidos a temperaturas (até 200°C) e pressões elevadas (≈ 1500 psi). Inicialmente descrita em 1995 pela empresa *Dionex*, esta técnica reduz o tempo de extração e o consumo de solventes, simplificando e automatizando a preparação das amostras. [64,65]

Nesta técnica, o solvente é bombeado para o interior da célula de extração que contém a amostra. Esta célula é sujeita a temperaturas elevadas, de modo a acelerar a cinética de extração, e a pressões elevadas, de forma a manter o solvente no estado líquido. [66]

A Figura 1.12 apresenta o equipamento de ASE da Thermo Fisher utilizado neste trabalho. Este equipamento possui um sistema de extração sequencial, com capacidade de extrair de forma automatizada até 24 amostras.



Figura 1.12 - Equipamento ASE 350 da Dionex (Adaptado de [67])

Os principais fatores para a otimização do método extração são: a temperatura, a pressão, o tipo de solvente e a composição da matriz.

- Temperatura

A temperatura é o parâmetro mais importante na extração acelerada por solvente. Variando a temperatura, as propriedades dos solventes também se alteram. A utilização de temperaturas elevadas durante o processo de extração diminui a viscosidade e a tensão superficial do solvente, facilitando a penetração do solvente na matriz e a eficiência da extração. O aumento da temperatura também

aumenta a capacidade de solubilização do solvente e facilita o enfraquecimento das interações analito-matriz (forças de Van der Waals, ligações de hidrogénio e interações dipolo-dipolo), aumentando, desta forma, a taxa de difusão dos analitos para o solvente. A energia térmica permite quebrar as interações coesivas soluto-soluto e as interações adesivas soluto-matriz, diminuindo a energia de ativação necessária para o processo de desadsorção. [68-70]

- Pressão

Os solventes orgânicos apresentam pontos de ebulição baixos, pelo que a utilização de temperaturas elevadas implica um ajuste na pressão.

A utilização de pressões elevadas permite não só manter o solvente no estado líquido a uma temperatura superior ao seu ponto de ebulição, como facilita o processo de extração, uma vez que o solvente pressurizado é forçado a entrar nos poros da matriz, possibilitando o contacto com os analitos e a sua remoção. [68,70-72]

- Solvente

O solvente deve ter a capacidade de solubilizar os analitos de interesse e, ao mesmo tempo, manter a matriz intacta. Para uma extração eficiente, a polaridade do solvente deve ser compatível com a polaridade dos analitos. No entanto, em alguns casos, misturas de solventes com diferentes polaridades pode ser aplicada para a extração de uma gama mais alargada de compostos. Não são recomendados ácidos fortes (HCL, H₂SO₄, HNO₃), pois danificam as células de extração. A ASE permite utilizar solventes em condições que não são possíveis nos métodos convencionais, no entanto a seletividade da extração diminui, uma vez que pode resultar não só na solubilização dos analitos, como dos componentes da matriz. [71,72]

- Composição da matriz

O efeito da matriz na eficiência da extração depende da sua composição. As amostras sólidas, como solos, alimentos, polímeros, são matrizes muito complexas que apresentam diferentes propriedades químicas e físicas, diferentes grupos de compostos orgânicos ou partículas de diferentes tamanhos. Estes parâmetros influenciam a absorção e a retenção dos analitos. De forma a otimizar a solubilização dos compostos, devem ser aplicadas condições adequadas de temperatura, pressão e solvente. [70,71]

Um dos parâmetros que caracteriza os analitos e a sua interação com a matriz é o coeficiente de partição octanol/água ($\log K_{ow}$). Este coeficiente mede a hidrofobicidade dos compostos e está relacionado com a solubilidade em água. Quanto maior o valor do coeficiente de um composto, menor é a solubilidade em água e maior é tendência de ficar adsorvido à matriz. Os HAP apresentam valores de $\log K_{ow}$ que variam entre 3 e 7 (Tabela 1.1)

Muitas vezes não é possível extrair apenas o grupo de compostos pretendido e, portanto, é necessário realizar um passo de limpeza posteriormente ao processo de extração. [70,71]

1.5.1.2.1. Preparação da amostra

Dependendo do tipo de amostras sólidas, pode ser necessário um pré-tratamento, nomeadamente, um passo de moagem, dispersão e secagem da amostra. No caso dos amostradores POCIS usados neste trabalho, foram especialmente importantes os passos de dispersão e secagem.

A agregação de partículas e a compactação dos materiais sobre pressão pode comprometer a eficiência da extração. Deste modo, é importante fazer uma dispersão da amostra com materiais inertes, como a terra de diatomáceas. ^[71,72]

Muitas amostras ambientais contêm elevado teor em água, o que pode comprometer não só a dispersão das partículas que constituem a amostra, como a extração dos analitos uma vez que a água interfere com os solventes orgânicos apolares, impedindo que estes cheguem aos compostos alvo. Neste tipo de amostras, a escolha de solventes mais polares, como a acetona ou metanol, ou o uso de mistura de solventes é o mais indicado.

Para além disso, os processos de secagem a quente ou a frio, a liofilização e a utilização de agentes de secagem, como a terra de diatomáceas, devem ser considerados, especialmente quando são usados solventes não polares na extração, atendendo sempre às propriedades físico-químicas dos compostos a extrair, nomeadamente, a sua volatilidade. ^[71,72]

1.5.1.2.2. Extração

Na extração acelerada por solvente, a amostra sólida é colocada no interior de uma célula adequada, cujas extremidades são depois bem apertadas à mão. Seguidamente, estas células são colocadas no suporte giratório pelo utilizador e, automaticamente, o equipamento coloca a célula e o respetivo frasco de recolha nas posições iniciais. Quando ambos estão alinhados, o braço robótico do aparelho transfere a célula para o interior do forno, onde ocorre o processo de extração. A Figura 1.13 esquematiza o processo da ASE.

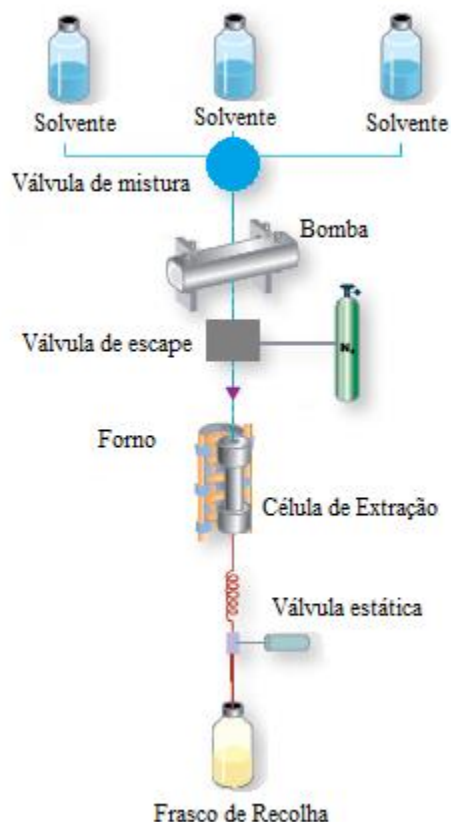


Figura 1.13 - Processo de extração acelerada por solvente pelo aparelho ASE 350 (Adaptado de [67])

Quando a célula está dentro do forno, a bomba é acionada e começa a bombear o solvente ou mistura de solventes para a célula. Após a passagem do solvente, a válvula estática fecha, o que permite a pressurização da célula até ao ponto de ajuste (1500 psi). Como o solvente expande à medida que é aquecido, a pressão aumenta quando a válvula estática é fechada. Quando a pressão atinge os 200 psi acima do ponto de ajuste, a válvula estática abre para aliviar a pressão e de seguida volta a fechar. De forma a facilitar o retorno da pressão ao ponto de ajuste, a bomba volta a bombear mais solvente fresco para o interior da célula. [67,69]

A célula que contém a amostra é seguidamente aquecida no forno até à temperatura definida no método. Quando é atingida a temperatura pretendida, é iniciado o ciclo estático durante um tempo definido pelo utilizador. Os ciclos estáticos permitem introduzir solvente fresco, com um certo volume, durante o processo de extração. Depois de cada ciclo estático, o solvente fresco é bombeado através da célula para remover os analitos da amostra. [67,69]

O número de ciclos estáticos também é previamente programado e no final do ciclo estático, a célula de extração é lavada e purgada com azoto. Estes ciclos garantem uma extração exaustiva e eficiente, que é caracterizada por recuperações elevadas, menor tempo de extração e menor volume de solvente usado. [67,69]

No final, os extratos são filtrados e recolhidos em frascos. Dependendo das condições de extração, pode ser necessário recorrer a etapas de preparação adicionais e técnicas de *clean-up* para limpeza do extrato.

- Células de extração

Na extração acelerada por solvente são usadas células de aço inoxidável ou *Dionium*, disponíveis em vários tamanhos: 1 mL, 5mL, 10 mL, 22 mL, 34 mL, 66 mL e 100 mL (Figura 1.14).



Figura 1.14 - Células de extração: Dionium e aço inoxidável ^[73]

As células de *Dionium* são usadas em amostras que necessitam de um pré-tratamento ácido ou básico, por exemplo, na análise de alimentos e de combustíveis renováveis, o que permite aumentar o número de aplicações do sistema ASE. ^[67]

As células de aço inoxidável são constituídas por diferentes peças, como filtros porosos de cerâmica, vedantes e filtros O-ring que devem ser substituídos ao fim de 30 a 50 utilizações (Figura 1.15).

Dependendo do tipo de matriz, pode ser necessário colocar um filtro no interior das células de extração, de modo a garantir a retenção da maioria dos interferentes. Os filtros podem ser de vidro ou celulose e são de utilização única, sendo descartados no final de cada extração.

Figura 1.15 - Constituintes das células de extração ^[74]

A ASE pode ser aplicada na recuperação de diversos compostos em diferentes tipos de amostras sólidas, por exemplo, na indústria alimentar, ambiental e farmacêutica. A Tabela 1.8 apresenta as vantagens e desvantagens da extração acelerada por solvente.

Tabela 1.8 - Vantagens e desvantagens da ASE ^[75]

Vantagens	Desvantagens
Rápido (tipicamente 15 minutos por amostra)	Requer fontes de ar e azoto para funcionar
Automatizado	Necessárias lavagens entre amostras para prevenir contaminações
Pequenas quantidades de solvente ($\sim 45\text{mL}$)	Entupimento das linhas caso os analitos ou elementos da matriz precipitem quando arrefecidos
Elevadas temperaturas e pressões	Possibilidade de compactação de matrizes com partículas finas, dificultando a extração

Filtração in-line

Erros no sistema param a corrida, sendo necessário um acompanhamento frequente

Caro

1.5.1.3. Concentração e troca de solvente

Muitas vezes o extrato obtido por estas técnicas não é suficientemente concentrado para atingir os limites de quantificação pretendidos. Assim, é necessário recorrer a um passo de concentração do extrato por evaporação de solvente, geralmente atingindo-se um volume final de 0,5 – 1mL. Equipamentos como o Turbovap, em que a amostra é colocada num banho termostatzado em contacto com uma corrente de azoto, permitem a evaporação do solvente da amostra até ao volume desejado. Também durante este passo, realiza-se a troca do solvente usado na extração, substituindo-se por um solvente compatível com o processo cromatográfico.

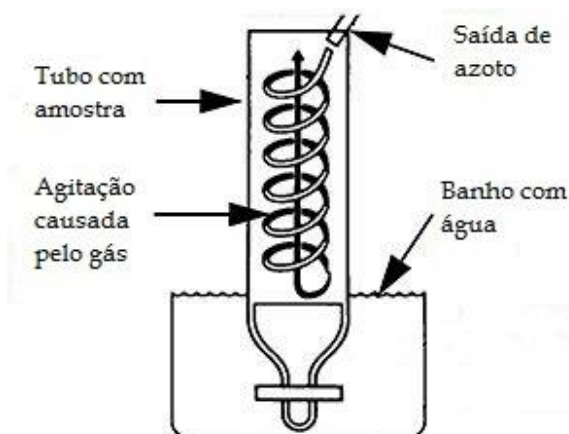


Figura 1.16 - Equipamento Turbovap e esquema do seu funcionamento

1.5.2. Cromatografia - Princípios Gerais

A cromatografia é uma técnica analítica que permite a separação de substâncias químicas presentes numa mistura complexa e, quando associada a detetores adequados, permite a identificação e quantificação dessas substâncias. ^[76]

O início da cromatografia como método analítico é atribuído ao botânico russo Michael Tswett que, em 1903, descreveu a separação dos pigmentos de plantas usando uma coluna de vidro contendo carbonato de cálcio.

A partir de 1940 começaram a ser descritos diferentes tipos de técnicas cromatográficas. Martin e Synge (1941) descreveram a técnica de cromatografia de partição com duas fases líquidas e o seu trabalho permitiu-lhes a atribuição do prémio Nobel da Química em 1951. James and Martin (1952) introduziram a cromatografia gás-líquido. Spedding e Tompkins (1949) desenvolveram a cromatografia de troca iónica. Porath e Flodin (1959) descreveram a cromatografia de exclusão molecular. Piel (1966) introduziu a cromatografia líquida de alta eficiência. ^[77,78]

Na cromatografia, os componentes da mistura são dissolvidos ou arrastados por uma fase móvel, que pode ser um gás (cromatografia gasosa) ou um líquido (cromatografia líquida), através de uma fase estacionária imiscível que está fixa numa superfície ou coluna, podendo ser um sólido, um líquido ou um gel. A separação cromatográfica baseia-se na diferente distribuição dos componentes da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária e depende da natureza de ambas.

Os componentes que são fortemente retidos ou apresentam maior afinidade com a fase estacionária movem-se mais lentamente, enquanto que os que são fracamente retidos movem-se mais rapidamente.

Ao longo da análise, os compostos que constituem a amostra vão sendo separados e vão eluir com tempos de retenção diferentes, permitindo que sejam detetados individualmente. Quando são lidos no detetor e com um software específico, origina um cromatograma que representa a resposta do detetor (sinal) em função do tempo de eluição. ^[79]

O cromatograma é uma representação gráfica importante que permite ver a eluição dos picos correspondentes aos compostos em análise. Na Figura 1.17 está representado um cromatograma típico.

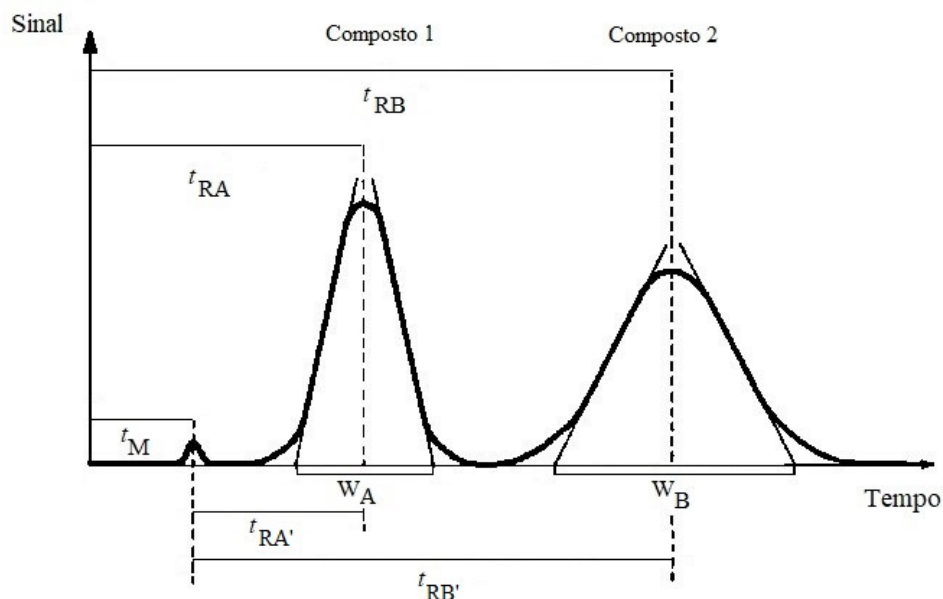


Figura 1.17 – Cromatograma típico com identificação dos parâmetros teóricos mais importantes

Todos os compostos em análise têm um tempo de retenção (t_R) específico. Este parâmetro corresponde ao tempo necessário para cada componente percorrer a coluna desde a injeção até à deteção. O tempo morto (t_M) ou tempo na fase móvel corresponde ao tempo de retenção de uma molécula que não sofre qualquer interação com a fase estacionária, ou seja, que não fica retida na coluna. A partir destes parâmetros é possível determinar o tempo de retenção ajustado ($t_{R'}$) que é equivalente ao tempo em que as moléculas são retidas pela fase estacionária. Este parâmetro é dado pela seguinte equação: ^[76]

$$t_{R'} = t_R - t_M \quad \text{Equação 1.1}$$

O fator de capacidade ou fator de retenção (k') relaciona o tempo que o composto permanece na fase estacionária com o tempo na fase móvel e expressa-se pela seguinte equação:

$$k' = \frac{t_{R'}}{t_M} \quad \text{Equação 1.2}$$

Para dois compostos, A e B, é possível determinar o fator de separação ou seletividade (α) e é definido como a razão entre o fator de capacidade do analito mais retido relativamente ao do analito menos retido. Quanto maior o valor de α , maior o afastamento entre dois picos adjacentes e melhor será a seletividade do sistema cromatográfico. O fator de separação é dado pela seguinte expressão:

$$\alpha = \frac{k'_A}{k'_B} \quad \text{Equação 1.3}$$

Pode ocorrer ainda que os dois analitos tenham o mesmo tempo de retenção, o que significa que os analitos não se separam, ocorrendo um fenômeno denominado co-eluição que é expresso matematicamente por $\alpha = 1$.

O coeficiente de distribuição (K_d) descreve a razão entre a concentração do soluto na fase estacionária (C_s) e na fase móvel (C_m) e é representado por: ^[76]

$$K_d = \frac{C_s}{C_m} \quad \text{Equação 1.4}$$

A separação ocorre apenas se os coeficientes de distribuição dos analitos forem diferentes. Valores de K_d elevados permitem uma melhor separação entre os picos.

A boa separação entre dois compostos que atravessam uma coluna é o resultado da contribuição da diferença entre os tempos de eluição dos picos, pois quanto mais afastados estiverem melhor será a separação, e amplitude dos picos, uma vez que quanto menor a largura dos picos melhor a separação.

A eficiência da coluna é determinada através do número de pratos teóricos da coluna (N), que corresponde ao número de equilíbrios que ocorrem ao longo da coluna cromatográfica. Este parâmetro pode ser relacionado com o tempo de retenção (t_R) e a largura dos picos (W) ou com a largura a meia altura dos picos ($W_{1/2}$) pelas seguintes expressões:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad \text{ou} \quad N = 5,545 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad \text{Equação 1.5 e 1.6}$$

O número total de pratos teóricos (N) também pode ser determinado pela relação entre a comprimento da coluna cromatográfica (L) e a altura equivalente a um prato teórico (H), a qual é expressa pela seguinte equação:

$$N = \frac{L}{H} \quad \text{Equação 1.7}$$

A altura equivalente a um prato teórico (H) corresponde ao comprimento da coluna requerido para que se estabeleça o equilíbrio do soluto entre a fase móvel e estacionária. Quanto menor for a altura do prato, maior será o valor de N e, conseqüentemente, mais estreito será o pico e mais eficiente é a coluna. A eficiência da coluna é, portanto, a capacidade de eluição com o mínimo de dispersão do analito. ^[76]

A eficiência da coluna cromatográfica também pode ser avaliada pela equação de Van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad \text{Equação 1.8}$$

Sendo,

A, B e C constantes para o sistema cromatográfico

u o fluxo da fase móvel

Esta equação obtém-se traçando uma curva que relaciona a altura equivalente a um prato teórico com a velocidade da fase móvel (u_x) ou fluxo

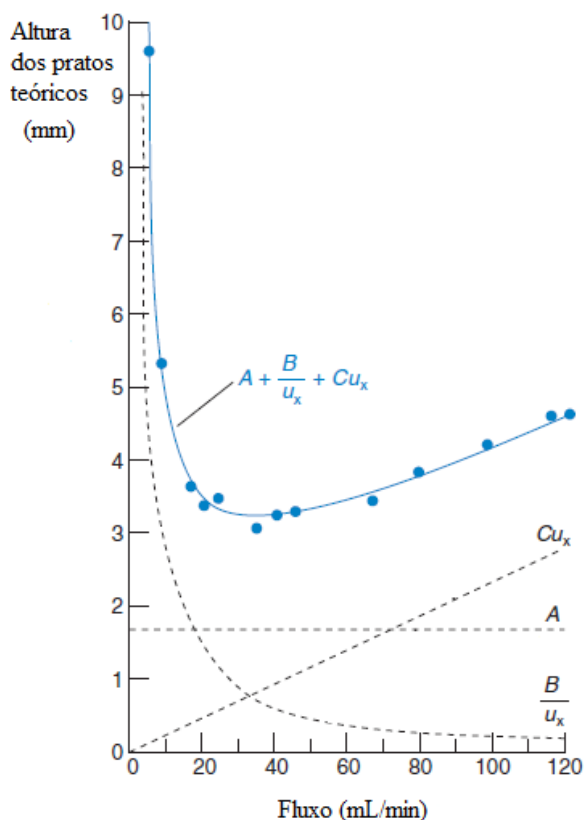


Figura 1.18 - Representação da equação de Van Deemter (Adaptado de [79])

A eficiência máxima da coluna é atingida operando com a velocidade ótima $u_{opt} = (B/C)^{1/2}$, correspondente ao valor mínimo da altura equivalente de um prato teórico. [80]

O termo A corresponde ao alargamento da banda cromatográfica causado pelos diferentes caminhos seguidos pelas moléculas do analito ao longo da coluna (Figura 1.19). Este termo pode ser minimizado quando a fase estacionária consiste em partículas uniformemente pequenas. Quanto menor o diâmetro das partículas, menor é a possibilidade de formação de caminhos múltiplos.

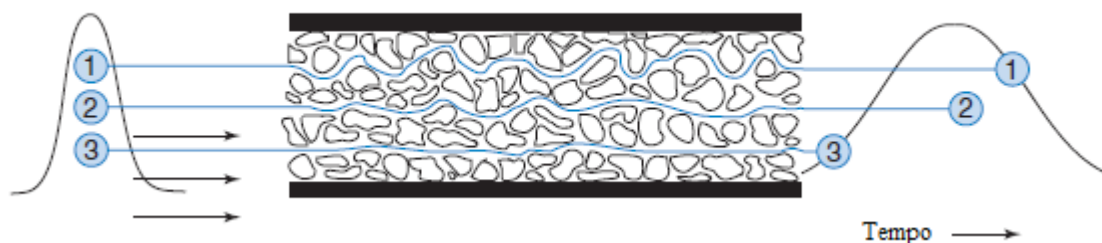


Figura 1.19- Efeito dos múltiplos caminhos no alargamento do pico Adaptado de [79])

O termo B resulta da difusão longitudinal, ou seja, da dispersão do soluto ao longo da coluna. A difusão longitudinal ocorre quando uma banda permanece durante muito tempo dentro da coluna de separação, ou seja, quando os tempos de retenção são elevados, a banda difunde-se em todas as direções, incluindo no sentido longitudinal, e produz o alargamento da banda cromatográfica. Para reduzir este efeito utiliza-se fluxos elevados da fase móvel.

O termo C descreve a transferência de massa do analito entre a fase móvel e a fase estacionária e está relacionado com velocidade de adsorção/desadsorção ou difusão do soluto entre as fases. Fenómenos como a estagnação da fase móvel entre os poros da fase estacionária, diferentes velocidades de transferência do analito ao longo da coluna e baixa desadsorção e/ou difusão do analito contribuem para o aumento do termo C e consequentemente o alargamento do pico.

A resolução (R_s) é um parâmetro que quantifica a capacidade da coluna na separação de dois picos adjacentes e é dada pela expressão: [76]

$$R_s = 2 \left(\frac{t_{RB} - t_{RA}}{W_A + W_B} \right) \quad \text{Equação 1.9}$$

Sendo,

t_{RA} e t_{RB} os tempos de retenção do composto A e B, respetivamente

W_A e W_B a largura na linha de base dos picos A e B.

A resolução da coluna pode também ser relacionada com o número de pratos teóricos, bem como com os fatores de retenção e a seletividade e é dada pela seguinte equação:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B}{1 + k_B} \right) \quad \text{Equação 1.10}$$

Sendo,

k_B o fator de retenção da espécie que se move mais lentamente e α a seletividade

1.5.2.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A análise dos HAP é feita, maioritariamente, por cromatografia líquida, nomeadamente cromatografia líquida de alta eficiência.

A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) é uma técnica analítica usada para amostras com compostos não voláteis e termolábeis. Este método aplica elevadas pressões sobre o solvente (fase móvel) para que este percorra a coluna e arraste consigo os compostos a separar, consoante a afinidade com a fase estacionária. Os principais componentes de um cromatógrafo líquido são o reservatório para os solventes, a bomba que impulsiona a fase móvel, o injetor automático para a introdução da amostra, uma coluna de separação, o detetor e o sistema de aquisição e tratamento de dados. Na Figura 1.19 está representado um esquema simplificado dos vários componentes que constituem um sistema de HPLC.

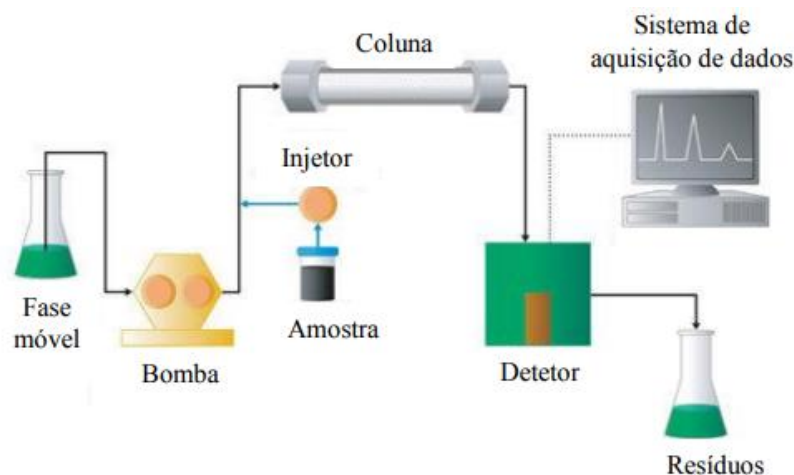


Figura 1. 20 - Componentes do HPLC (Adaptado de [81]).

1.5.2.1.1. Coluna Cromatográfica

A coluna cromatográfica é o componente do sistema onde se dá a separação das substâncias que compõem a amostra. A escolha da coluna adequada para a separação dos compostos de interesse deve ter em conta os fatores relacionados com fase estacionária, nomeadamente o tipo de enchimento, o tamanho dos poros e o tamanho e forma das partículas, bem como com os fatores físicos relacionados com as dimensões da coluna, como o comprimento e o diâmetro interno. [82]

As colunas cromatográficas para HPLC são geralmente de aço inoxidável, vidro ou plástico e apresentam comprimentos variáveis entre 10 e 30 cm e diâmetros internos entre 1-22,5 mm.

Ao longo dos anos foram estudados diferentes materiais como suporte de fase estacionária, como a terra de diatomáceas, o óxido de alumínio, o carbonato de cálcio, o hidróxido de cálcio e óxido de magnésio. Atualmente o suporte de colunas cromatográficas mais comum são as partículas de sílica microporosas uma vez que têm elevada pureza, são permeáveis ao solvente e apresentam elevadas áreas superficiais na ordem das centenas de metros quadrados por grama de sílica (m^2/g). [54]

A sílica dissolve-se a pH superior a 7,5. Assim, tanto em cromatografia de polaridade de fase normal, onde a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, como em fase reversa, onde a fase mais polar é a fase móvel, seja em fase estacionária só de sílica ou de fase ligada, o pH de trabalho deve variar entre 2-8. No caso da separação de compostos básicos, com pH entre 8-12, devem ser utilizados suportes poliméricos de poliestireno que são estáveis numa gama de pH entre 1-13. Nestes suportes, a fase estacionária é ligada covalentemente ao polímero. [54,82]

O enchimento de fase ligada consiste na ligação covalente de um grupo funcional aos grupos hidroxilo livres da sílica. Consoante o grupo funcional seja polar ou apolar, vão existir fases ligadas de enchimento polar e apolar, respetivamente. A Figura 1.20 representa o mecanismo de ligação do grupo funcional à sílica e a Tabela 1.9 apresenta as fases polares e apolares mais usuais nas colunas de fase ligada.

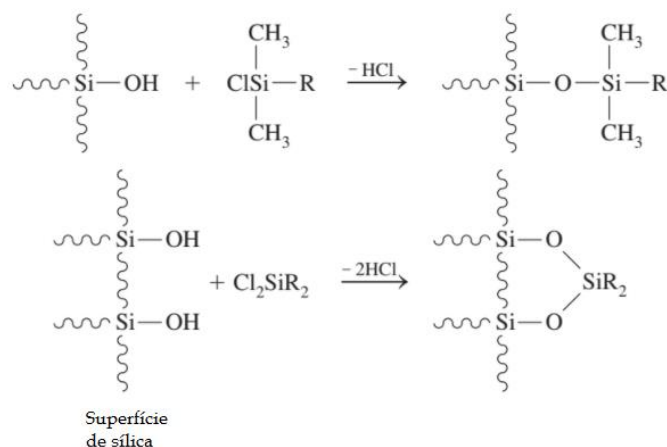


Figura 1.21 - Mecanismo de ligação dos grupos funcionais à sílica (Adaptado de [83])

Tabela 1.9 - Colunas de fase ligada: fases polares e apolares mais representativas ^[83]

Fases polares mais comuns		Fases apolares mais comuns	
R = (CH ₂) ₃ NH ₂	Amino	R = (CH ₂) ₁₇ CH ₃	Octadecil
R = (CH ₂) ₃ C≡N	Ciano	R = (CH ₂) ₇ CH ₃	Octil
R = (CH ₂) ₂ OCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH	Diol	R = (CH ₂) ₃ C ₆ H ₅	Fenil

O tamanho das partículas que compõem o enchimento das colunas cromatográficas varia entre 1,7 a 10 µm, mas a maioria das colunas cromatográficas apresenta partículas com 5 µm. As partículas pequenas esféricas permitem obter melhores resoluções porque garantem um fluxo uniforme ao longo da coluna e ao mesmo tempo permitem um tempo de corrida mais rápido porque a distância de difusão do soluto entre a fase móvel e estacionária é menor. ^[54,83]

Neste trabalho foi utilizada a coluna LiChrospher®PAH, concebida para análise de HAP. Possui um enchimento de fase ligada octadecil à sílica, com partículas esféricas de 5 µm de tamanho, 15 nm de tamanho dos poros e área superficial de 200 m²/g. O pH de trabalho deve ser entre 2-7,5.

Para aumentar o tempo de vida útil das colunas e evitar a degradação provocada pela ligação irreversível de partículas à fase estacionária e retenção de impurezas, é colocada uma pré-coluna entre o injetor e a coluna cromatográfica com a mesma fase estacionária que a coluna principal, o que permite a remoção de impurezas e partículas. ^[83]

1.5.2.1.2. Detetores

Em HPLC podem ser utilizados diversos tipos de detetores consoante as características químicas e estruturais dos compostos em análise. O detetor ideal deve ter uma sensibilidade adequada à análise, boa estabilidade e reprodutibilidade, originar uma resposta linear, ter um tempo de resposta curto e manter a amostra inalterada. Na Tabela 1.10 encontram-se descritos os limites de detecção aproximados, em ng, para os detetores mais utilizados em HPLC.

Tabela 1.10 - Limites de detecção aproximados para os detetores mais utilizados em HPLC com eluição por gradiente ^[83]

Detetor	Limite de detecção (ng)
Ultravioleta	0,1 – 1
Índice de refração diferencial	100 – 1000
Eletroquímico	0,01 – 1
Fluorescência	0,001 – 0,01
Condutividade	0,5 – 1
Espetrometria de massa	0,1 – 1

Ao longo dos anos a utilização de sistemas de detecção híbridos tem vindo a aumentar. Estes sistemas consistem na agregação de dois ou mais detetores num único instrumento e permite obter mais informações sobre cada amostra em análise.

Os HAP são compostos que na sua maioria apresentam fluorescência. Neste trabalho foi utilizado o detetor de fluorescência (FLD) para a análise de quinze compostos e o detetor de díodos (DAD) para a analisar um composto, o acenaftileno, que não apresenta fluorescência.

- Detetor de Díodos

O detetor de díodos é utilizado na leitura de compostos que absorvem radiação na região dos ultravioleta (190 - 400 nm) e visível (400 - 750 nm). Todos os detetores UV-Vis são baseados na Lei de Lambert-Beer e na capacidade de um composto absorver radiação num determinado comprimento de onda, de acordo com a sua estrutura química e dos grupos funcionais presentes na molécula. [84]

A Figura 1.22 explica o princípio do funcionamento do detetor DAD: as lâmpadas de tungsténio e deutério emitem radiação na gama do UV-visível que é focada por um sistema de lentes acromáticas. A luz policromática passa pela célula de fluxo da amostra e é dispersa na rede de difração em diferentes comprimentos de onda, cujas intensidades são medidas pelo arranjo de díodos. [85]

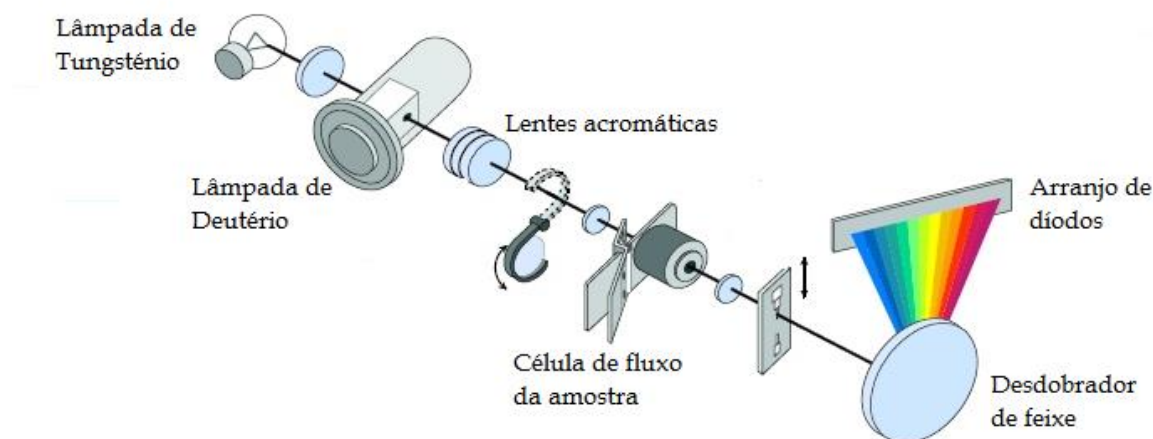


Figura 1.22 - Detetor de díodos (Adaptado de [85])

Este detetor permite monitorizar a amostra em diferentes comprimentos de onda, o que é especialmente útil quando o comprimento de onda máximo dos analitos são diferentes. Tem capacidade de medir a absorvância em função do tempo, gerando um cromatograma, e a absorvância em função do comprimento de onda, originando um espectro. Permite também ajustar o máximo de absorvância ou comprimento de onda de modo a aumentar a sensibilidade e a seletividade para um

composto. A capacidade de recolha de espectros permite a construção de bibliotecas espectrais que, por comparação, possibilita a identificação dos compostos e análise da pureza dos picos correspondentes.^[86]

- **Detetor de Fluorescência**

Os detetores de fluorescência podem ser 100 vezes mais sensíveis que os detetores UV-Vis, sendo particularmente útil em amostras com baixas concentrações de analitos. Estes detetores medem a emissão ótica da radiação do analito depois de ter sido excitado com radiação de maior energia. Ao contrário dos detetores UV-Vis, os detetores de fluorescência medem um sinal fraco da luz em vez da diferença entre intensidades (absorvância).^[87]



Figura 1.23 - Representação simplificada da absorção numa molécula

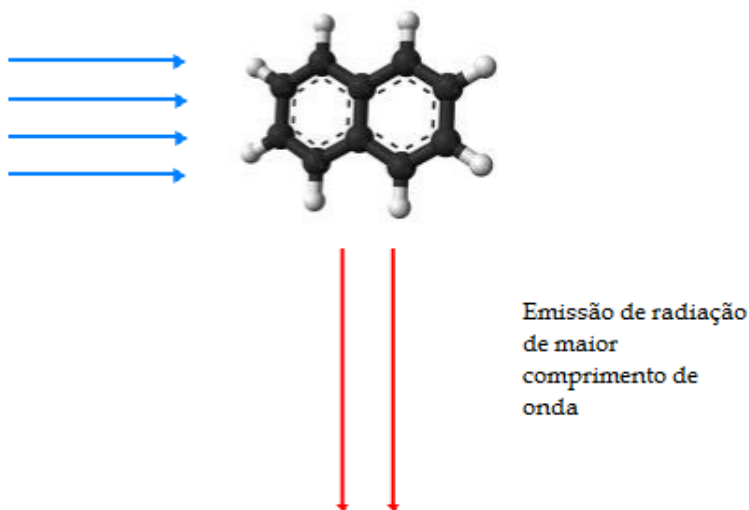


Figura 1.24 - Representação simplificada da emissão de radiação numa molécula (fluorescência)

A fluorescência é influenciada pela estrutura química dos compostos. A presença de anéis aromáticos rígidos, como o benzeno, naftaleno ou antraceno, de heteroaromáticos, como a piridina, quinolina ou acridina, e de grupos eletrodadores (NH_2 , OH , OCH_3 , $\text{N}(\text{CH}_3)_2$) favorecem o

fenômeno da fluorescência. Por outro lado, grupos eletroreceptores (NO_2 , CN , Cl , COOH , COH) diminuem a fluorescência. Fatores como a temperatura, o efeito do solvente, o pH, a concentração do analito e a presença de outros compostos também influenciam a intensidade da radiação emitida. [88]

A Figura 1.25 explica o princípio do funcionamento do detetor de fluorescência: o feixe de luz emitida pela lâmpada de xénon é focado por um conjunto de lentes e entra no monocromador de excitação, que transmite radiação apenas no comprimento de onda de excitação selecionado para a célula de fluxo da amostra, cuja intensidade é depois medida por um detetor. A radiação de excitação estimula a amostra a emitir fluorescência, que é focada pelas lentes de emissão e entra no monocromador de emissão. O monocromador de emissão também transmite radiação apenas no comprimento de onda de emissão selecionado para um tubo fotomultiplicador (PMT), que converte a luz emitida em sinal de corrente. [89]

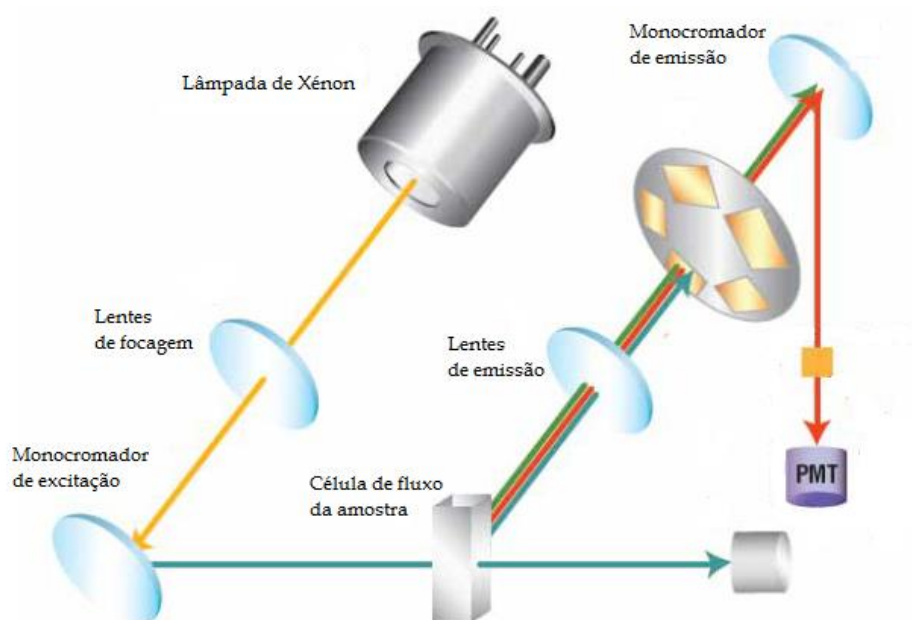


Figura 1. 25 - Detetor de fluorescência

Este detetor também permite a construção de bibliotecas espectrais, as quais podem ser utilizadas na identificação dos analitos.

1.6. Validação dos Resultados

A validação de um método analítico tem como objetivo demonstrar que o método, nas condições em que é praticado, tem as características necessárias para a obtenção de resultados credíveis e adequados à qualidade exigida.

Um método de ensaio é um processo que envolve várias manipulações suscetíveis de acumular erros sistemáticos e/ou aleatórios, o que, em algumas situações, pode alterar de forma significativa o valor do resultado final.

O processo de validação envolve o estudo de parâmetros característicos por avaliação direta e por avaliação indireta. ^[90]

1.6.1. Avaliação Indireta

Este tipo de validação é efetuado por determinação e evidência das características do método. Inclui estudos da representatividade do método, ou seja, se as características determinadas correspondem ao objetivo do ensaio/calibração; estudos dos princípios (fundamentos) teóricos do método para evidenciar a base científica do método; estudos de interferências e fontes de erro para delinear a sua aplicabilidade e dominar a sua execução; estudos de otimização das condições operatórias e/ou robustez do método para permitir uma harmonização da sua execução e estudos dos parâmetros característicos do método (por exemplo: campo de aplicação, exatidão, repetibilidade, precisão intermédia, reprodutibilidade, limites de deteção e quantificação, incerteza, etc.), para conhecer a qualidade dos seus resultados. ^[91]

1.6.1.2. Especificidade/Seletividade

A seletividade de um método refere-se à sua capacidade em identificar e distinguir um determinado analito numa mistura complexa, sem interferência de outros componentes. Ou seja, um método é específico quando permite discriminar o analito relativamente a outras substâncias. Assim, é importante averiguar as possíveis interferências eventualmente presentes na amostra.

Um método analítico pode ser considerado específico e seletivo quando na prática se verificam taxas de recuperação próximas de 100%, sendo que este valor é dependente do tipo de metodologia utilizada e do tipo de analito em estudo. ^[90]

1.6.1.3 Linearidade e Gama de Trabalho

- Curvas de Calibração

A quantificação num método analítico requer o conhecimento sobre a dependência entre a resposta do sistema de medição e a concentração ou uma quantidade de substância conhecida. Esta relação é conseguida através da curva de calibração, que deve ser efetuada, em cada dia de análise, cumprindo os critérios de aceitação definidos internamente

Numa calibração analítica são preparadas uma série de soluções padrão com concentrações conhecidas que são medidas num equipamento analítico, nas mesmas condições das amostras a analisar. Com os diferentes pontos experimentais é construído um gráfico de calibração que relaciona a concentração em função do sinal do equipamento e, por interpolação, é determinada a concentração dos analitos nas amostras.

A análise da linearidade e da gama de trabalho deve ser efetuada ao longo da fase de implementação/ validação do método de ensaio ou sempre que se justifique. Em análises de rotina, a linearidade da curva de calibração usada em determinado método analítico deve ser avaliada através da sua representação gráfica juntamente com a análise do coeficiente de correlação. ^[90,92]

1.6.1.4. Precisão

Esta característica pretende avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.

- Repetibilidade

A repetibilidade exprime a precisão de um método de ensaio realizado em condições idênticas, em que são efetuados uma série de medições sobre uma mesma amostra, nas mesmas condições laboratoriais e operacionais. Na prática, a análise de duplicados (ou outro número de réplicas) deve ser encarada como uma ferramenta de deteção de erros acidentais e de controlo da repetibilidade. Em termos numéricos, a precisão pode ser estudada com base no desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação).

- Precisão intermédia

A precisão intermédia refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar, nomeadamente:

- diferentes analistas;
- diferentes equipamentos;
- diferentes épocas;
- com/sem verificação da calibração.

Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar. ^[90]

- Robustez

A robustez corresponde à capacidade do método produzir o mesmo resultado, mantendo o seu desempenho analítico inalterável perante pequenas alterações das condições experimentais. Este parâmetro apresenta alguns aspetos vantajosos, por exemplo, maior robustez de um método implica maior insensibilidade de fatores experimentais deliberadamente alterados, o que faz com que o método continue a conduzir a valores concordantes, apesar das alterações efetuadas. Ou seja, quanto maior a robustez de um método, maior a confiança do mesmo relativamente à sua precisão. ^[92]

1.6.2. Avaliação Direta

A avaliação direta visa conhecer a exatidão dos métodos de ensaio, que é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceite como convencionalmente verdadeiro.

Os processos normalmente usados neste tipo de avaliação são: o uso de materiais de Referência Certificados (MRC), realização de ensaios interlaboratoriais, testes comparativos e ensaios de recuperação nas matrizes das amostras que se pretendem analisar. ^[90,92]

Este trabalho envolveu praticamente a validação do método de extração dos amostradores passivos através da execução de ensaios de recuperação em amostras fortificadas com o grupo de HAP em estudo. A validação do método de ensaio para analisar os HAP por HPLC-DAD-FLD já foi efetuada previamente pelo laboratório da EPAL. ^[93]

1.6.2.1. Ensaios de Recuperação

O conceito “recuperação” reflete a relação entre a quantidade de analito recuperada no processo face à quantidade real presente na amostra. Este tipo de ensaios pretende identificar a viabilidade do método através da adição de uma quantidade conhecida de uma solução padrão numa amostra (designada por fortificação da amostra), de modo a verificar a quantidade de analito obtida. O estudo da percentagem de recuperação permite a verificação da existência de efeitos sistemáticos introduzidos por causas desconhecidas, também conhecido por efeito de matriz. Este efeito baseia-se na presença de interferentes característicos de determinadas matrizes, que causam um aumento ou diminuição da resposta analítica. Na prática, a percentagem de recuperação indica a eficácia com que o analito introduzido numa amostra é recuperado pelo método. ^[92] A percentagem de recuperação é dada por:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{C_A}{C_t} \times 100 \quad \text{Equação 1.10}$$

Sendo C_A a concentração do composto na amostra fortificada obtida experimentalmente e C_t a concentração teórica do composto na amostra fortificada.

2. Parte Experimental

2.1. Equipamento e Material

2.1.1. Equipamento

- Banho de ultrassons, Selecta
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), ThermoFisher Ultimate 3000, equipado com:
 - Coluna cromatográfica LiChrospher®PAH
 - Detetor de fluorescência, Thermo nº de série 8132662
 - Detetor de díodos, Thermo nº de série 8132662
 - Software de gestão do equipamento e dados: Chromeleon versão 6,80SR14
- Cromatógrafo gasoso, Agilent modelo 7890B, acoplado ao espectrómetro de massa, Agilent modelo 5977A, equipado com:
 - Coluna cromatográfica HP-5MS (5% Metilfenilsiloxano, 95% Dimetilpolisiloxano, 60 m x 0,25 mm d.i x 0,25 µm de espessura de filme
 - Injetor *split-splitless*
 - Analisador de massa: Quadrupolo
 - Fonte Iónica: Impacto Eletrónico (*EI*)
 - Software de aquisição de dados: *Agilent MassHunter Quantitative Analysis* versão B.07.01
- Evaporador automático Turbovap II, Zymark
- Aparelho de extração acelerada por solvente, ASE 350 Dionex, nº série 12010047, Thermo Scientific, equipado com:
 - Células de extração em aço inoxidável de 34 mL, Dionex
 - Frascos de recolha de 250 mL, Dionex
 - Software de gestão do equipamento: Chromeleon 7.2, Dionex
- Sistema de obtenção de água ultra pura, modelo Mili-Q Advantage A-10, Millipore
- Homogeneizador, modelo Ultra Turrax Tube Drive Control, IKA
- Balança analítica, modelo PJ3000, Mettler
- *Field-Emission Gun Scanning Electron Microscope* (FEG-SEM) JSM 700 1F

2.1.2. Material

Nesta secção descreve-se o material específico utilizado na aplicação desta metodologia. Não é apresentado o material de uso corrente de laboratório.

- Amostradores Passivos: EWL (*Exposmeter Water Lipophilic*), EWH (*Exposmeter Water Hydrophilic*), ExposMeter AB.
- Filtros de membrana de celulose, 30 mm, Dionex
- Filtros de seringa de PTFE, 0,22 µm, Olimpeak

- Cartucho Waters OASIS HLB, 6 mL, 200 mg
- Tubos de concentração de 200 mL, Biotage
- *Vials* de vidro âmbar, 2 mL, VWR

2.1.3. Reagentes e soluções

2.1.3.1 Reagentes gerais

- Ciclohexano, 99%, C_6H_{12} , SupraSolv, Merck
- n-hexano, 99%, C_6H_{14} , UniSolv, Merck
- Metanol, 99,9%, CH_3OH , Carlo Erba Reagents
- Diclorometano, 99,8%, CH_2Cl_2 , Chromasolv, Sigma-Aldrich
- Tolueno, 99,8%, C_7H_8 , Carlo Erba Reagents,
- Acetonitrilo, 99,9%, CH_3CN Carlo Erba Reagents
- Acetona, 99,5%, CH_3COCH_3 , SupraSolv, Merck
- Água ultrapura (Millipore)
- Terra de diatomáceas, Dionex

2.1.3.2. Padrões

- Mistura padrão comercial de HAP, 10 mL, Dr. Ehrenstorfer
- Padrão comercial individual de Acenaftileno, 10 mL, Dr. Ehrenstorfer
- Padrões internos deuterados
 - d6-benzeno, 99,5%, C_6D_6 , Cil
 - d21-BHT, 98%, $C_{15}H_{24}OD_2$, Sigma-Aldrich
 - d5-clorobenzeno, 99%, C_6H_4ClD , Sigma-aldrich
 - d34-hexadecano, 98%, $CD_3(CD_2)_{14}CD_3$, Cil
 - d8-naftaleno, 99%, $C_{10}D_8$, Cil
 - d10-fenantreno, 99%, $C_{14}D_{10}$, Cil
 - d5-fenol, 98%, C_6D_5OH , Cil
 - d10-p-xileno, 98%, $C_6D_4(CD_3)_2$, Cil
 - d62-escalano, 98,9%, $C_{30}D_{62}$, Cil
 - d10-1-metilnaftaleno, 98%, $C_{11}D_{10}$, Cil

2.2. Análise dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

Todos os ensaios de recuperação foram executados tendo como base o método de ensaio do Sistema de Gestão da Qualidade dos Laboratórios de Ensaio da EPAL na determinação de HAP por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, com detecção por fluorescência (FLD) e *diode-array* (DAD). Este método aplica-se na quantificação dos 16 HAP em águas de consumo humano, águas superficiais e águas subterrâneas.

A determinação dos compostos alvo nas amostras é efetuada após a calibração do equipamento, que é realizada através do método do padrão externo, com recurso a soluções padrão de calibração. Todas as soluções padrão (mistura comercial, intermédia, soluções de calibração e soluções de controlo) são armazenadas a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ e ao abrigo da luz.

2.2.1. Soluções Padrão Comercial de HAP

A mistura padrão comercial de HAP em acetonitrilo (10 mL), Dr. Ehrenstorfer possui as seguintes concentrações individuais:

Tabela 2.1 - Concentração dos HAP na mistura padrão comercial

Nome da Substância	Acrónimo	Concentração (mg/L)
Naftaleno	Naf	100
Acenaftileno	Acenf	100
Acenafteno	Acen	50
Fluoreno	Flu	25
Fenantreno	Fen	50
Antraceno	Ant	10
Fluoranteno	Flr	50
Pireno	Pir	50
Benzo[a]antraceno	BaA	25
Criseno	Cri	25
Benzo[b]fluoranteno	BbF	25
Benzo[k]fluoranteno	BkF	10
Benzo[a]pireno	BaP	25
Dibenzeno[a,h]antraceno	DahA	50
Benzo[g,h,i]perileno	BghiP	50
Indeno[1,2,3-cd]pireno	Ind	100

O padrão comercial individual de Acenaftileno, Dr. Ehrenstorfer tem uma concentração aproximada de 10 mg/L.

2.2.2. Preparação da Solução Padrão Intermédia

Transfere-se 1 mL da mistura padrão comercial para um balão volumétrico de 50 mL com acetonitrilo. Adiciona-se 10 mL do padrão comercial individual de Acenaftileno. Esta solução tem um prazo de validade de três meses e possui as seguintes concentrações:

Tabela 2.2 - Concentrações individuais dos HAP na Solução Padrão Intermédia

HAP	Concentração (mg/L)	HAP	Concentração (mg/L)
Naf	2	BaA	0,5
Acenf	4	Cri	0,5
Acen	1	BbF	0,5
Flu	0,5	BkF	0,2
Fen	1	BaP	0,5
Ant	0,2	DahA	1
Flr	1	BghiP	1
Pir	1	Ind	2

2.2.3. Preparação das Soluções Padrão de Calibração

Transfere-se as seguintes quantidades da Solução Padrão Intermédia de HAP para balões volumétricos de 5 mL com acetonitrilo.

Tabela 2.3 - Preparação das Soluções Padrão de Calibração

Solução de Calibração	Volume da Solução Intermédia (µL)	Solução de Calibração	Volume da Solução Intermédia (µL)
P1	200	P7	50
P2	140	P8	40
P3	120	P9	30
P4	100	P10	26
P5	80	P11	20
P6	60	P12	8

Uma vez realizada a curva de calibração, estas soluções deixam de ter validade, sendo novamente preparadas sempre que seja necessário efetuar nova calibração.

As soluções padrão de calibração assim preparadas têm as seguintes concentrações:

Tabela 2.4 - Concentração dos HAP nas Soluções Padrão de Calibração

HAP	Soluções Padrão de Calibração (µg/L)											
	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12
Naf	-----	56	48	40	32	24	20	16	12	10,4	8	-----
Acenf	160	112	96	80	64	48	40	-----	-----	-----	-----	-----
Acen	-----	-----	-----	20	16	12	10	8	6	5,2	4	-----
Flu	-----	14	12	10	8	6	5	4	3	2,6	2	-----
Fen	-----	-----	24	20	16	12	10	8	6	5,2	4	-----
Ant	-----	-----	-----	4	3,2	2,4	2	1,6	1,2	1,04	0,8	0,32
Flr	-----	-----	24	20	16	12	10	8	6	5,2	4	-----
Pir	40	28	24	20	16	12	10	8	6	5,2	-----	-----
BaA	-----	-----	-----	-----	8	6	5	4	3	2,6	2	0,8
Cri	-----	-----	-----	-----	8	6	5	4	3	2,6	2	-----
BbF	-----	-----	12	10	8	6	5	4	3	2,6	2	-----
BkF	-----	-----	-----	4	3,2	2,4	2	1,6	1,2	1,04	0,8	-----
BaP	-----	-----	-----	10	8	6	5	4	3	2,6	2	0,8
DahA	-----	-----	-----	20	16	12	10	8	6	5,2	4	1,6
BghiP	40	28	24	20	16	12	10	8	6	5,2	-----	-----
Ind	80	56	48	40	32	24	20	16	12	10,4	-----	-----

Para efetuar a reta de calibração de cada HAP, regista-se o valor da altura do pico cromatográfico obtido para esse composto e a sua concentração nas soluções padrão de calibração (P1 a P12). Aceita-se a reta de calibração se o coeficiente de correlação (r) for superior a 0,995.

2.2.4. Solução Padrão de Controlo

Em cada série de análises são preparados padrões de controlo a partir da solução intermédia de HAP, cujas concentrações correspondem aos padrões de calibração P3, P5 e P10. Estas soluções são preparadas independentemente, de acordo com o procedimento descrito para as soluções padrão de calibração. Os padrões de controlo são injetados entre cada 5 amostras.

2.2.5. Condições Cromatográficas

Na Tabela 2.5 estão indicadas as condições cromatográficas para a análise de HAP pelo método interno HPLC com detetor de fluorescência (FLD) e detetor de díodos (DAD).

Tabela 2.5 - Condições do HPLC-FLD-DAD

Temperatura da coluna	28 °C
Fluxo	1 mL/min
Volume de injeção	20 µL

Gradiente de eluição: Solventes		
Tempo (min)	Acetonitrilo (%)	Água (%)
0,0	60	40
5,0	60	40
12	100	0
29	100	0

Na Tabela 6.2 do Anexo III estão indicadas as condições de detecção dos HAP no detetor de fluorescência.

Após a calibração do sistema cromatográfico e verificação da calibração com os padrões de controlo, procede-se à análise das amostras, nas mesmas condições. A identificação dos compostos é efetuada por comparação dos tempos de retenção dos picos no cromatograma das amostras com os tempos de retenção dos picos no cromatograma da solução padrão de controlo, dentro da gama de trabalho de cada composto. Na Tabela 6.3 do Anexo III estão indicados tempos de retenção aproximados dos HAP e no Anexo IV um cromatograma típico da solução padrão de controlo P5. A concentração dos parâmetros em análise em cada amostra é determinada a partir da equação da reta obtida para cada composto.

2.3. Ensaaios de Recuperação

2.3.1. Amostragem Passiva na Recuperação dos HAP

A capacidade de adsorção dos três amostradores passivos (SPMD, POCIS-Pesticidas e POCIS-Fármacos) foi estudada inicialmente em laboratório, em condições controladas, simulando a adsorção do grupo de compostos alvo (HAP), através de ensaios de recuperação.

Nestes ensaios, os amostradores foram colocados numa tina de vidro com 3,5 L de água ultra pura fortificada com 7 mL da solução padrão de calibração P5, com agitação constante (Figura 2.1). Os amostradores são armazenados a $-18 \pm 5^{\circ}\text{C}$ antes da sua utilização e após o tempo de exposição, caso não se proceda logo à extração dos compostos.



Figura 2.1 - Amostrador imerso em água fortificada com HAP

Os primeiros testes de extração foram realizados com ultrassons, de forma encontrar as condições em que se obtinham as melhores percentagens de recuperação. A extração com ultrassons é uma técnica simples, em que o amostrador é imerso num solvente dentro de um goblé e colocado num banho de água ($\approx 25^\circ \text{C}$) com um sistema de ultrassons.

A eficiência da extração depende do tipo de solvente. Deste modo, foram testados quatro solventes diferentes – metanol, acetonitrilo, diclorometano e ciclohexano, na extração fracionada com ultrassons (30 min + 30 min + 30 min) com uma quantidade de solvente fixa (250 mL + 250 mL + 250 mL), usando amostradores expostos aos compostos durante um período de 3 dias. Todos os extratos são concentrados no evaporador automático Turbovap ($2,5 \pm 0,5 \text{ bar}/35^\circ \text{C}$) e analisados individualmente por HPLC-FLD-DAD.

No processo de otimização da técnica de extração, foram ainda testadas a influência da quantidade de solvente (200, 100 mL), tempo de exposição dos amostradores aos compostos em estudo (1,3,7 e 14 dias), modo de extração (simples ou fracionada) e técnicas de *clean up* dos extratos.

Paralelamente, foi também experimentada a extração acelerada por solvente como técnica alternativa ao ultrassons, variando o solvente de extração.

2.4. Técnicas de Preparação de amostra na recuperação dos HAP

As técnicas de preparação de amostras utilizadas na análise de HAP, em condições testadas, otimizadas ou já implementadas no laboratório da EPAL, foram estudadas na recuperação dos compostos em estudo, nomeadamente a extração em fase sólida (SPE) e a extração acelerada com solvente (ASE), de modo a comparar as duas técnicas de extração e posteriormente, no caso da ASE, testar com os amostradores passivos.

2.4.1. SPE: Método Implementado

Adiciona-se 1 mL de uma solução de concentração conhecida idêntica à solução padrão de calibração P5 num balão volumétrico de 500 mL com água ultra pura. Coloca-se o balão no sistema SPE, com o cartucho Waters OASIS HLB (6mL, 200 mg) e procede-se à ativação do programa de extração que executa as seguintes tarefas:

- Ativação: 6 mL de diclorometano + 6 mL de metanol + 6 mL de água ultra pura a 10 mL/min
- Passagem da solução: 250 mL da solução a 30 mL/min
- Lavagem do Cartucho: em corrente de azoto durante 60 minutos
- Eluição: 4 + 2 + 2 mL de diclorometano a 2 mL/min

O extrato final é concentrado num sistema de evaporação com corrente de azoto (Turbovap), a $2,5 \pm 0,5$ bar e a uma temperatura do banho de água de aproximadamente 35°C , até cerca de 0,3 mL sem deixar ir à secura. Adiciona-se em seguida 2 mL de acetonitrilo ao extrato e agita-se para homogeneizar, deixando evaporar até cerca de 0,5 mL. Transfere-se o extrato para um vial e armazena-se entre 2 e 8°C .

2.4.2. ASE: Método otimizado em lamas e adaptado ao trabalho

Coloca-se 5 g de terra de diatomáceas numa célula de extração e adiciona-se 1 mL de uma solução de concentração conhecida idêntica à solução padrão de calibração P5. As condições de extração são:

- Modo de extração: Fluxo
- Solvente: Diclorometano
- Pressão: 1500 psi
- Temperatura do forno: 80°C
- Ciclo estático
 - Tempo: 5 minutos
 - Número de ciclos: 1
 - Volume: 60%

O extrato final é submetido a uma concentração no sistema Turbovap, como descrito em 2.4.1

2.5. Utilização dos Amostradores Passivos *in loco*

Depois do processo de extração de ultrassons ser otimizado, os amostradores foram colocados em locais de interesse pela EPAL, nomeadamente no Reservatório dos Olivais (Figura 2.2), em dois períodos distintos: 6 meses e 10 dias, com intuito de monitorizar HAP e compostos desconhecidos.

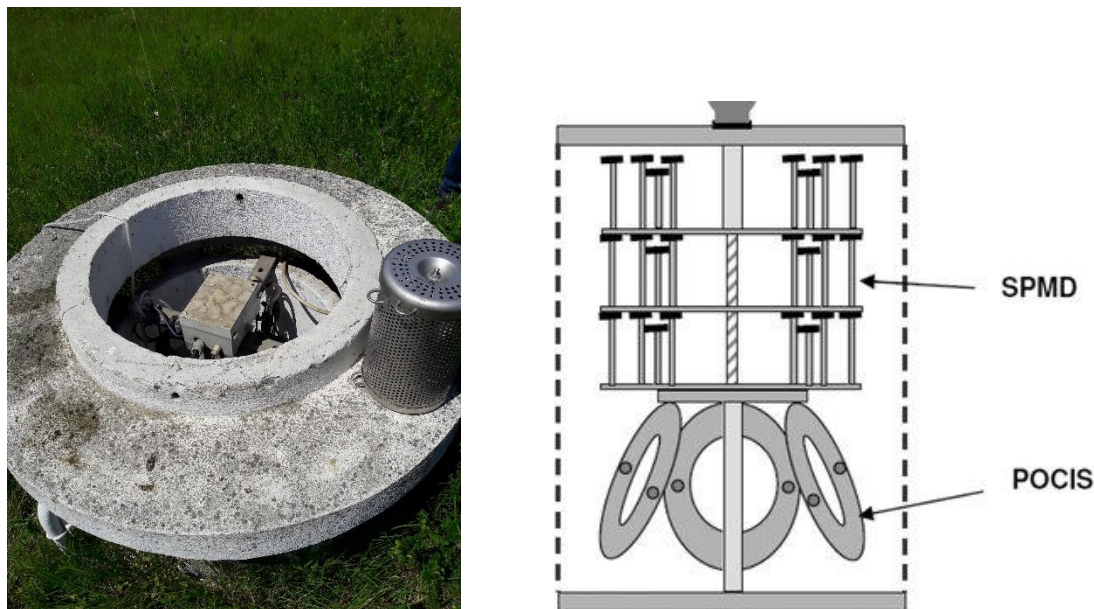


Figura 2.2 - Local de amostragem no Reservatório dos Olivais (esquerda); Configuração da gaiola de aço inoxidável com os suportes dos amostradores (direita)

Após o período de exposição, as membranas SPMD foram submetidas à extração pelo método de ultrassons otimizado. Os extratos foram posteriormente concentrados e analisados em HPLC-FLD-DAD e GC-MS em modo *full scan*. No caso dos amostradores POCIS, estes foram abertos e o adsorvente foi misturado com terra de diatomáceas (Figura 2.3) e colocado em células de extração. A extração foi realizada no sistema ASE, à temperatura ambiente, com uma mistura de metanol: tolueno: diclorometano (1:1.5).



Figura 2.3 - Adsorvente do POCIS- Pesticidas (esquerda) e Fármacos (direita) com terra de diatomáceas

2.6. Análise de Compostos Desconhecidos

A análise de compostos desconhecidos usando os amostradores passivos foi realizada simultaneamente à monitorização de HAP no local de interesse. A análise desses compostos é efetuada pelo método de ensaio semi-quantitativo desenvolvido pelo Sistema de Gestão e Qualidade dos Laboratórios de Ensaio da EPAL, que consiste na análise por cromatografia gasosa associada à espetrometria de massa, usando o modo *full scan*.

O método aplica-se na identificação e quantificação de compostos orgânicos não específicos na água de consumo humano, em águas superficiais e em águas subterrâneas, e ainda em águas de migração para substâncias orgânicas, derivadas de produtos acabados, como por exemplo, tubagens, membranas e revestimentos de proteção.

Neste método, uma mistura de padrões internos é adicionada ao extrato que depois é analisado por GC-MS em modo *full scan*, com ionização por impacto eletrónico (EI). Cada composto orgânico detetado é identificado, quando possível, tendo como referência o seu tempo de retenção e a comparação do seu espectro de massas com as bibliotecas de espectros de massa. A quantificação é efectuada por comparação com as respostas obtidas para os padrões internos deuterados. Como se trata de um método semi-quantitativo, as concentrações dos compostos orgânicos detetados são concentrações estimadas.

As interferências do método podem ser causadas por contaminantes de solventes, material de vidro e, principalmente, de interferentes provenientes dos amostradores passivos, derivados do processo de extração e tratamento de amostra, que podem induzir artefactos discretos e/ou aumento da linha de base dos cromatogramas. O uso de brancos permite a deteção e identificação da fonte de qualquer contaminação e são usados para corrigir resultados desses efeitos de contaminação.

Todas as soluções preparadas e que a seguir se descrevem, devem ser conservadas no escuro e a uma temperatura de $-18 \pm 5^{\circ}\text{C}$.

2.6.1. Soluções Padrão Primárias dos Padrões Internos Deuterados

Prepara-se as soluções padrão primárias dos padrões internos deuterados em balões volumétricos de 20 mL, usando acetona como solvente. Na Tabela 2.6 encontram-se os padrões internos a utilizar e as respetivas concentrações estimadas.

Tabela 2.6 - Concentração das soluções padrão primárias dos padrões internos deuterados

Padrão interno deuterado	Concentração (mg/mL)
d6-benzeno	2,0
d21-BHT ¹	8,0
d5-clorobenzeno	2,0
d34-hexadecano	1,0
d8-naftaleno	1,0
d10-fenantreno	2,0
d5-fenol	8,0
d10-p-xileno	1,0
d62-escalano ²	8,0

¹d2I-2,6-di-t-butil-4-metilfenol, ²esta solução é preparada com diclorometano

2.6.2. Solução Padrão Conjunta dos Padrões Internos Deuterados

Coloca-se 2,5 mL de cada uma das soluções padrão primárias dos padrões internos deuterados para um balão volumétrico de 25 mL e perfaz-se com acetona. Na Tabela 2.7 estão indicadas as concentrações de cada padrão interno deuterado na solução conjunta.

Tabela 2.7 - Concentração de cada padrão interno deuterado na solução conjunta

Padrão interno deuterado	Concentração (mg/mL)
d6-benzeno	0,20
d21-BHT	0,80
d5-clorobenzeno	0,20
d34-hexadecano	0,10
d8-naftaleno	0,10
d10-fenantreno	0,20
d5-fenol	0,80
d10-p-xileno	0,10
d62-escalano	0,80

2.6.4. Solução Padrão Primária de Injeção

Pesa-se cerca de 25 mg do padrão d10-1-metilnaftaleno e coloca-se num balão volumétrico de 25 mL. Dissolve-se e perfaz-se o volume do balão com diclorometano.

2.6.5. Solução Padrão de Fortificação do Padrão de Injeção

Adiciona-se 1 mL da solução primária de injeção num balão volumétrico de 10 mL e afere-se o balão com diclorometano. Esta solução tem uma concentração aproximada de 100 µg/mL.

2.6.6. Solução Teste da Coluna de GC

Adiciona-se 200 µL da solução padrão conjunta dos padrões internos deuterados (2.6.2) e 1000 µL da solução padrão de fortificação de injeção (2.6.5) para um balão volumétrico de 10 mL e afere-se com diclorometano. Na Tabela 2.8 estão indicadas as concentrações de cada padrão interno deuterado na solução teste da coluna de GC.

Tabela 2.8 - Concentração de cada padrão interno deuterado na solução teste da coluna de GC

Padrão interno deuterado	Concentração (mg/mL)
d6-benzeno	4,0
d21-BHT	16,0
d5-clorobenzeno	4,0
d34-hexadecano	2,0
d8-naftaleno	2,0
d10-fenantreno	4,0
d5-fenol	16,0
d10-p-xileno	2,0
d62-escalano	16,0
d10-1-metilnaftaleno	10,0

A solução teste da coluna de GC é analisada de 6 em 6 amostras, usando o mesmo método de análise para as amostras, de modo a avaliar o desempenho da coluna de GC e do MS, relativamente aos padrões internos em uso, garantindo que todos são detetados corretamente.

2.6.7. Preparação da Amostra

Ao extrato final já concentrado que se pretende analisar é adicionado 10 µL da solução padrão conjunta dos padrões internos deuterados (2.6.2) e 50 µL da solução padrão de fortificação de injeção do d10-1-metilnaftaleno (2.6.5).

2.6.8. Condições Cromatográficas

Na Tabela 2.9 estão descritas as condições do GC-MS para a análise de compostos desconhecidos.

Tabela 2.9 - Condições do GC-MS

GC	Temperatura do injetor	250 °C
	Modo de injeção	Splitless
	Volume de injeção	1 µL
	Gás de arraste/fluxo	Hélio, 1 mL/min
	Pressão	15,507 psi
MS	Condições do forno	6 min a 33 °C
	(Programa de Temperatura)	4 °C/min até 85 °C durante 2 min
		10 °C/min até 300 °C durante 25 min
	Tipo de analisador	Quadrupolo
	Tipo de Ionização	Ionização de Impacto Eletrônico
	Corrente de emissão	34,6 µA
	Energia de ionização	70 eV
	Tipo de scan	<i>Full Scan</i>
	Tempo de scan	3,4 scan/seg
	Temperatura de interface GC-MS	280 °C
	Temperatura fonte de ionização	200 °C
	Temperatura do quadrupolo	150 °C

2.6.9. Identificação dos Compostos Detetados

Os analitos desconhecidos nas amostras são analisados no modo *full scan*, em que a identificação dos analitos é realizada com base na comparação do seu espectro de massas obtido e a biblioteca de espectros do equipamento. A identificação do composto é efetuada com base na probabilidade calculada pelo *software*, considerando-se a correta identificação utilizando o *Match* e o *Reverse Match* superiores a 700 e probabilidades superiores a 50%. Contudo, é importante ter espírito crítico e fazer sempre uma análise cuidada dos resultados obtidos. Deve-se incluir também como critério a comparação visual entre o espectro de massas do pico desconhecido e o espectro de massas indicado pela biblioteca.

São usadas as quatro categorias abaixo descritas para definir o nível de confiança associado à identificação dos compostos detetados.

- A identificação positiva (P) indica que o espectro de massas e o tempo de retenção do composto são os mesmos que os obtidos com um padrão puro desse composto, nas mesmas condições de análise;
- A tentativa de identificação (T) indica que a identificação do composto foi obtida através de uma pesquisa numa biblioteca de espectros de massa, ou por interpretação dos princípios básicos da espectrometria de massa.
- O desconhecido (U) é qualquer composto que não esteja incluído numa das categorias acima descritas. Na tabela de resultados devem ser assinalados os quatro picos mais intensos do espectro de massas, em ordem decrescente de intensidades, juntamente com o potencial ião molecular.
- Não identificado (N) indica que o pico no espectro não é identificado por nenhuma das categorias anteriores. Na tabela de resultados também devem ser assinalados os quatro picos mais intensos do espectro de massas, em ordem decrescente de intensidades

2.6.10. Estimativa Semi-quantitativa da Concentração dos Compostos

Detetados

A quantificação de cada composto detetado é efetuada por comparação da sua resposta com o padrão interno apropriado, de acordo com o seguinte:

- Compostos com tempo de retenção entre d6-benzeno e o d8-naftaleno são quantificados relativamente ao padrão d5-clorobenzeno;
- Compostos que eluem entre d8-naftaleno e o d34-hexadecano são quantificados relativamente ao padrão interno d21-BHT;
- Compostos que eluem após o d34-hexadecano são quantificados relativamente ao padrão interno d10-fenantreno.

A massa estimada de cada composto no extrato do ASE é dada por:

$$\text{Massa estimada } (\mu\text{g/L}) = \frac{P_D \times I}{P_S} \times \frac{V_{\text{Extrato}}}{V_o} \times 1000 \quad \text{Equação 2.1}$$

Onde:

- P_D – área do pico do composto na amostra
- I – concentração de padrão interno no extrato (mg/L)
- P_S – área do pico do padrão interno deuterado na amostra
- V_o – volume de solvente extraído no ASE (mL)
- V_{extrato} – volume do extrato orgânico no vial (mL)

Logo, a massa estimada (μg) de cada composto captado no amostrador terá o valor absoluto determinado pela equação acima

3. Discussão e Resultados

3.1. Caracterização dos Amostradores

As Figuras 3.1 e 3.2 são imagens do amostrador POCIS obtidas por uma lupa eletrônica com ampliação x 27 da Faculdade de Ciências e por FEG-SEM JSM 700 1F (*Field-Emission Gun Scanning Electron Microscope*) do Micro Lab no Instituto Superior Técnico, respetivamente.



Figura 3.1 - Imagem do POCIS por uma lupa eletrônica com ampliação x 27

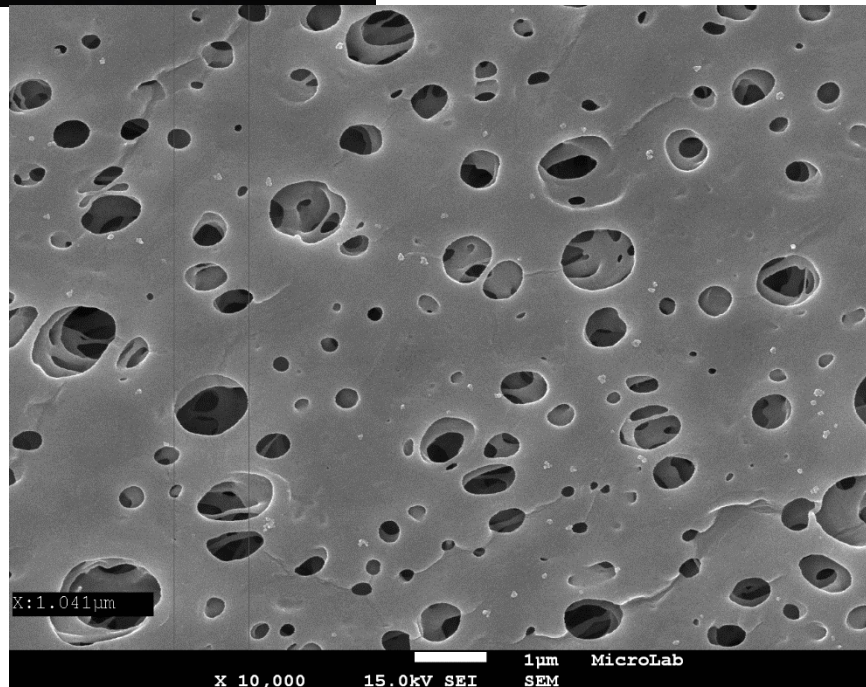


Figura 3.2 - Imagem do POCIS por FEG-SEM JSM 700 1F

A Figura 3.2 é uma amostra representativa da membrana do POCIS, onde são visíveis diferentes porosidades e várias camadas no material, lembrando um “queijo suíço”. Os poros de maiores dimensões têm cerca de 1 μm e foram encontrados poros com dimensões mais reduzidas, o que valida e confirma a informação existente na literatura quanto ao tamanho dos poros (100 nm). Relativamente ao fornecedor não foram encontradas especificações sobre as dimensões dos poros. Esta variedade de tamanhos está diretamente relacionada com a formação dos poros, em que bolhas de ar de diferentes dimensões passam aleatoriamente pelo interior do material, formando cavidades de diferentes tamanhos. Também são visíveis na imagem algumas impurezas, provavelmente partículas do adsorvente que se encontra no interior da membrana do POCIS.

A Figura 3.3 é uma imagem do amostrador SPMD obtida também por FEG-SEM JSM 700 1F.

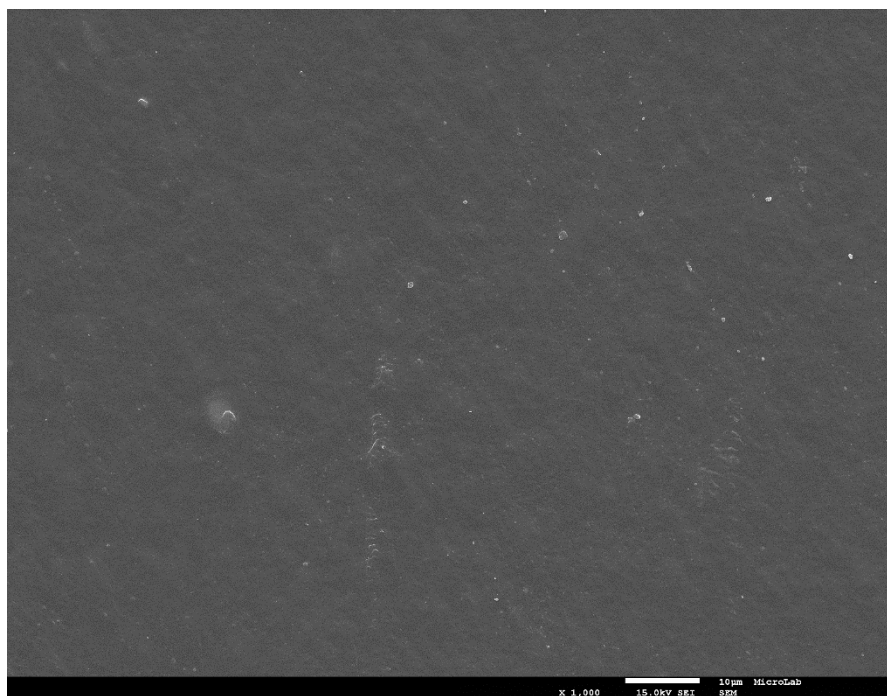


Figura 3.3 – Imagem do SPMD por FEG-SEM JSM 700 1F

As cavidades que existem no polietileno não são detetáveis pelo equipamento, uma vez que o material é transparente. No entanto pela Figura 3.3 é possível concluir que a superfície da membrana do SPMD é uniforme, estável e capaz de suportar a potência do feixe eletrónico (15 kV).

3.2. Otimização do método de preparação de amostra: Ultrassons

Os amostradores passivos foram sujeitos a diferentes condições durante o processo de recuperação dos HAP. Foi utilizado o sistema de ultrassons como método de extração e foram testadas diferentes variáveis, nomeadamente o tipo de solvente, o tempo de exposição aos compostos, a quantidade de solvente, o número de extrações e modo de extração.

3.2.1. Tipo de solvente e *clean-up*

Devido às características apolares dos compostos em estudo, inicialmente foi testada a eficiência da extração dos HAP por ultrassons com a membrana SPMD. Foram testados quatro solventes orgânicos diferentes - metanol, ciclohexano, diclorometano e acetonitrilo – com o modo de extração fracionado (250 mL + 250 mL + 250 mL) durante 1h 30min (30 + 30 + 30 min), com 3 dias de exposição da membrana em água fortificada com os compostos alvo. No Gráfico 3.1 estão indicadas as recuperações dos HAP obtidas com os diferentes solventes.

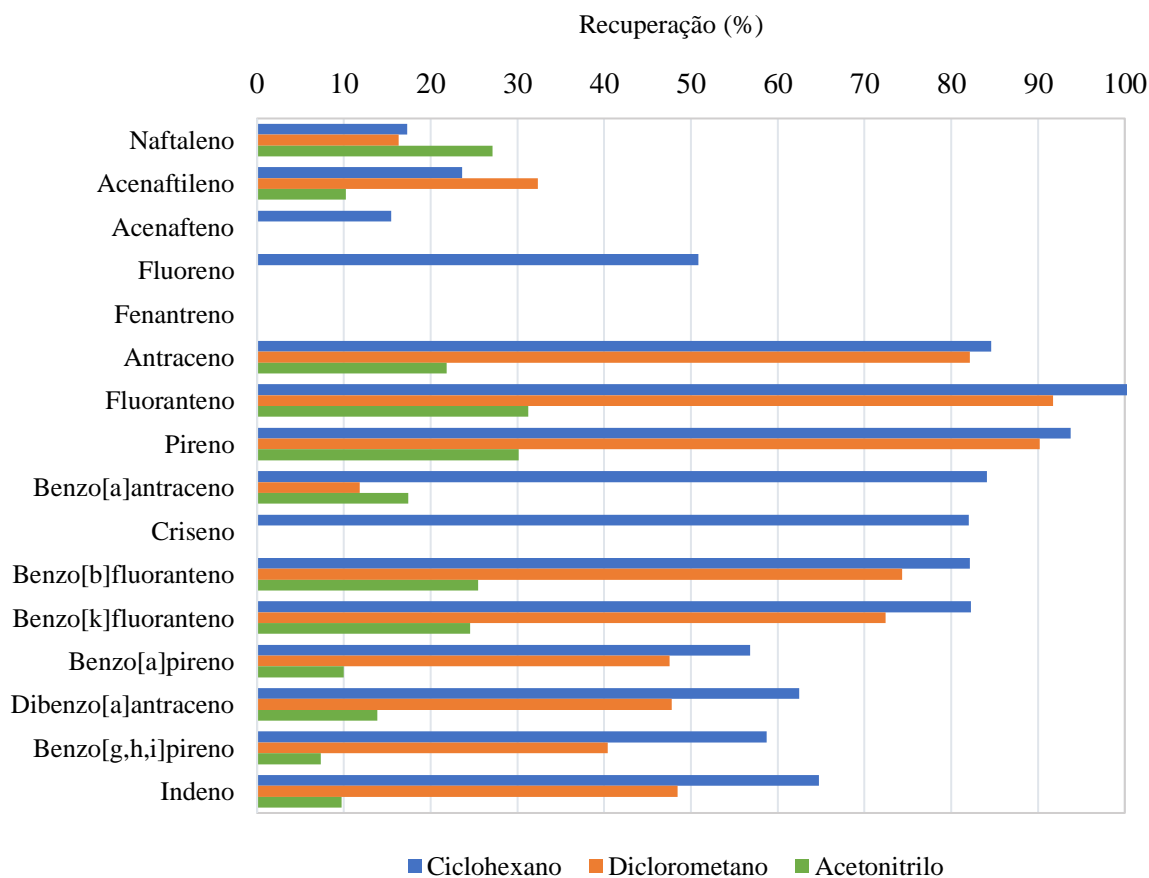


Gráfico 3.1 - Recuperações dos compostos extraídos com o ciclohexano, acetonitrilo e diclorometano ao fim de 1h 30min

Pelo Gráfico 3.1, o solvente em que se verificaram melhores recuperações foi com ciclohexano, entre 15% (Acenafeno) e 100% (Fluoranteno), sendo este o solvente escolhido para os ensaios seguintes. Verificou-se que com o metanol, os valores de recuperação foram nulos.

É importante referir que com todos os solventes testados, as recuperações dos compostos de menor massa molecular, como é o caso do Naftaleno, Acenafteno e Acenaftileno, foram sempre mais baixas relativamente aos compostos de maior massa molecular. No caso do Naftaleno, foram ainda encontradas concentrações vestigiais no vidro da tina usada durante a exposição do amostrador em água fortificada (2-3%) e no agitador magnético (1-2%).

Como se verifica também pelo Gráfico 3.1, alguns compostos não apresentam valores de recuperação uma vez que a sua identificação e quantificação foi dificultada pela presença de interferentes co-extraídos com os compostos, originando sobreposições de picos. Esses interferentes são constituintes do SMPD, nomeadamente oligómeros do polietileno, trioleína e suas impurezas, como ácido oleico e o oleato de etilo, que foram detetados na análise dos brancos. Os efeitos destes interferentes são particularmente visíveis nos tempos de retenção correspondentes ao Fluoreno, Fenantreno e ao Criseno.

Em consequência do ruído nos cromatogramas provocado pelos interferentes, testou-se a recuperação dos HAP com diferentes filtros de modo a escolher a melhor técnica de *clean-up* para os extratos. Verificou-se que para todos filtros testados (GHP - 0,45 μm ; PTFE - 0,45 μm e PTFE - 0,22 μm) não foram encontradas diferenças significativas, mesmo quando se realizavam duas filtrações, tendo sido recuperados na totalidade todos os compostos. Deste modo, optou-se pelo filtro de PTFE - 0,22 μm para os ensaios seguintes na remoção dos interferentes dos extratos, dadas as dimensões reduzidas do tamanho dos poros e as propriedades hidrofóbicas do filtro.

3.2.2. Tipo de amostrador

Para testar a fiabilidade dos três amostradores (SPMD, POCIS Fármacos e POCIS Pesticidas), foram comparados os seus desempenhos na acumulação dos HAP, nas mesmas condições de exposição (3 dias).

Com o amostrador POCIS Fármacos não foram obtidos valores de recuperação significativos para nenhum dos compostos. No caso do amostrador POCIS Pesticidas foi obtido apenas 5% para o Naftaleno, sendo este o composto menos apolar e de menor log K_{OW} do grupo dos HAP em estudo.

Para os ensaios de recuperação dos HAP seguintes, foram sempre utilizados o amostrador SPMD, que possui as características mais indicadas para a acumulação desta família de compostos.

3.2.3. Tempo de Exposição

Foi também estudado a influência do tempo de exposição dos amostradores passivos SPMD aos HAP. No Gráfico 3.2 encontram-se as medianas das recuperações dos HAP para 1,3,7 e 14 dias de exposição.

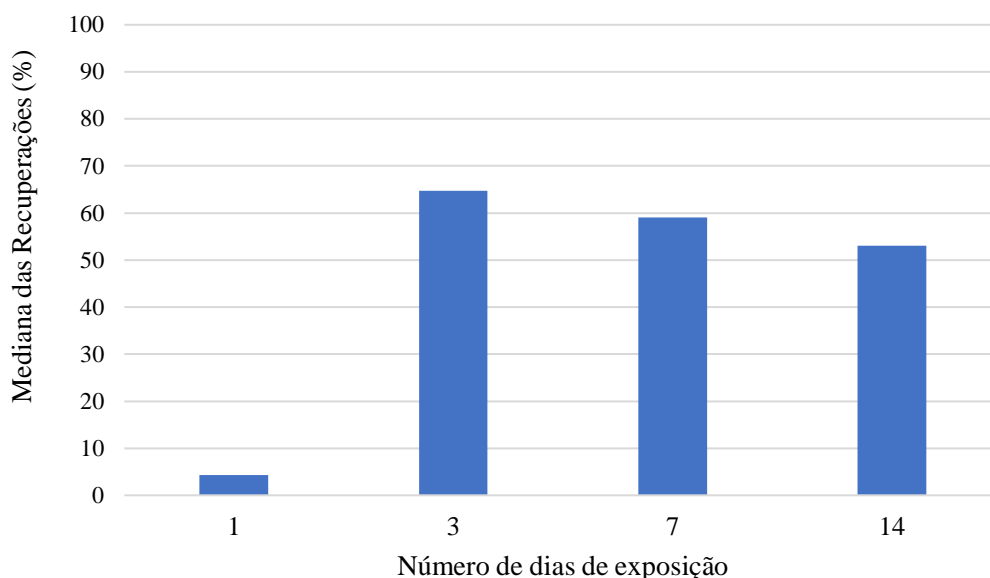


Gráfico 3.2 - Medianas das recuperações obtidas em função dos dias de exposição

No Gráfico 3.2 observa-se que apenas 1 dia de exposição não é suficiente para se obterem valores de recuperação significativos. Verifica-se também que as medianas das recuperações com 3, 7 e 14 dias de exposição são ligeiramente diferentes, havendo um decréscimo ao longo do tempo. A vantagem da mediana em relação à média, neste caso, é que a mediana pode dar uma melhor ideia de um valor representativo, uma vez que não é tão distorcida por valores extremamente altos ou baixos; como já revelado anteriormente, os HAP não apresentam todos a mesma percentagem de recuperação, havendo em alguns casos, grandes discrepâncias entre si.

As percentagens de recuperação obtidas para 3 dias de exposição variam entre 15,4 % (Acenafteno) e 100% (Fluoranteno), para 7 dias de exposição variam entre 5,2% (Acenaftileno) e 93% (Fluoranteno) e para 14 dias de exposição variam entre 2,2% (Acenaftileno) e 82,8% (Fluoranteno).

Estatisticamente, existem diferenças significativas entre os dias de exposição quanto às recuperações obtidas ($p < 0,05$), no entanto verificam-se valores de desvio padrão muito semelhantes, ou seja, a dispersão de resultados em torno da média é a mesma (Anexo V).

Para ensaios laboratoriais são suficientes apenas 3 dias de exposição. No caso da utilização dos amostradores em locais de interesse é importante deixar entre 7 a 14 dias, uma vez que a concentração de compostos orgânicos em águas superficiais é geralmente muito baixa.

3.2.4. Quantidade de solvente e número de extrações

Foi testada a influência da quantidade de solvente na extração dos compostos das membranas SPMD. No Gráfico 3.3 estão indicadas as recuperações médias obtidas com diferentes quantidades de ciclohexano (100, 200 e 250 mL) em função do número de extrações.

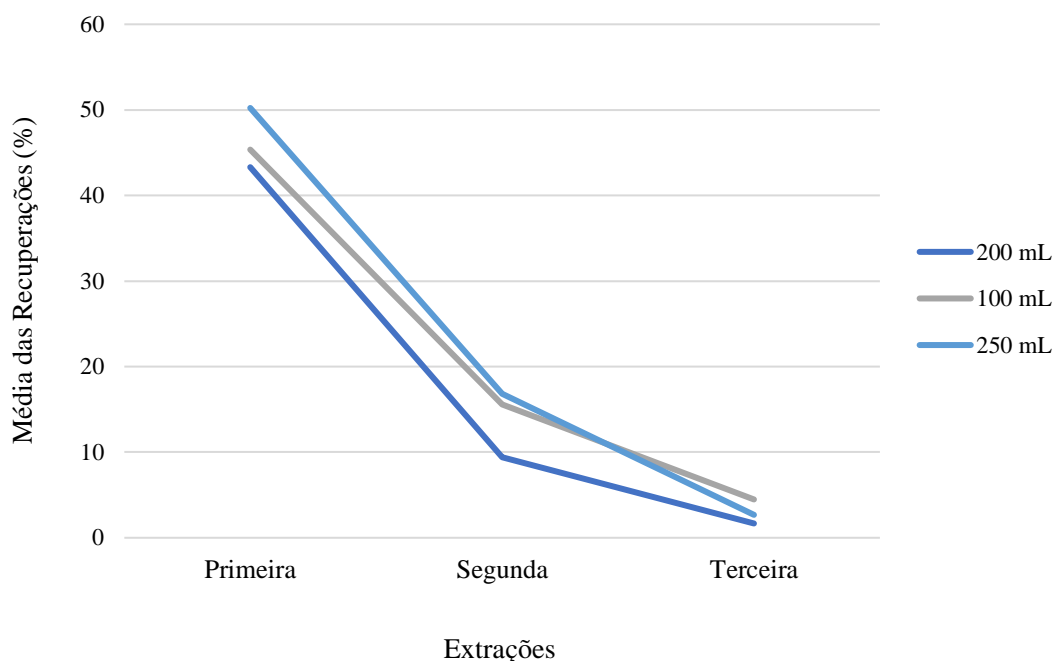


Gráfico 3.3 - Média das recuperações obtidas com diferentes quantidades de solvente (ciclohexano)

Pelo Gráfico 3.3 verifica-se que o valor médio das recuperações usando diferentes quantidades de solvente são da mesma ordem de grandeza nos diferentes momentos de extração. Estatisticamente existem diferenças significativas entre os diferentes ensaios ($p < 0,05$ - Anexo VI). Um exemplo que evidencia essa diferença: a média da segunda extração com 200 mL afasta-se das restantes duas; provavelmente essa diferença pode estar associada a algum erro experimental durante o processo de extração.

Contudo, a eficiência da extração não é fortemente dependente da quantidade de ciclohexano utilizada, não existindo uma relação linear entre a quantidade de solvente e a média das recuperações. Por exemplo, verificam-se recuperações ligeiramente superiores utilizando 100 mL em vez de 200

mL. No entanto foi escolhida a quantidade de 250 mL nas extrações seguintes usando os amostradores passivos, sendo este o volume ideal para os recipientes disponíveis que permite total imersão dos amostradores no solvente.

Também é possível verificar pelo gráfico que três extrações são suficientes para se obterem valores de recuperação aceitáveis.

3.2.5. Modo de Extração

Foi testada a influência do modo de extração simples (1h 30min) e fracionada (30 + 30 +30 min) na recuperação dos HAP dos amostradores. O Gráfico 3.4 compara os dois métodos quanto à percentagem de recuperação obtida para cada composto.

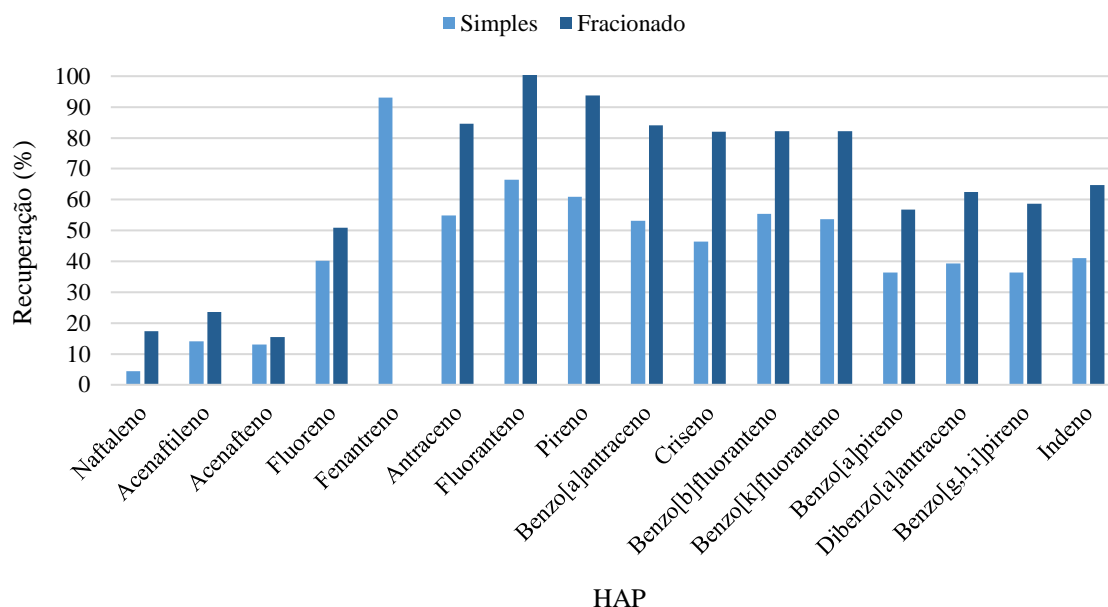


Gráfico 3.4 - Comparação das recuperações obtidas pelo método de extração simples e fracionada

Pelo Gráfico 3.4, verifica-se que com método da extração fracionada são obtidos valores de recuperação superiores comparativamente com método da extração simples, para todos os compostos. No caso do Fenantreno foram encontrados valores muito acima dos 100% devido à presença do interferente, pelo que não foi contabilizado. A utilização do filtro de PTFE - 0,22 µm permite eliminar a maioria dos interferentes na amostra, no entanto não é completamente eficaz.

3.2.6. Método Clássico vs. Método otimizado

Foi comparada a eficiência da extração do método otimizado de ultrassons com o método clássico sugerido pelos fornecedores. Este método consiste numa diálise à temperatura ambiente, na

qual a membrana, após exposição aos HAP, é colocada em 300 mL de ciclohexano durante 16 horas, sendo depois substituído por mais 300 mL de ciclohexano, por mais 6 horas.

No Gráfico 3.5 estão indicadas as recuperações obtidas pelos dois métodos.

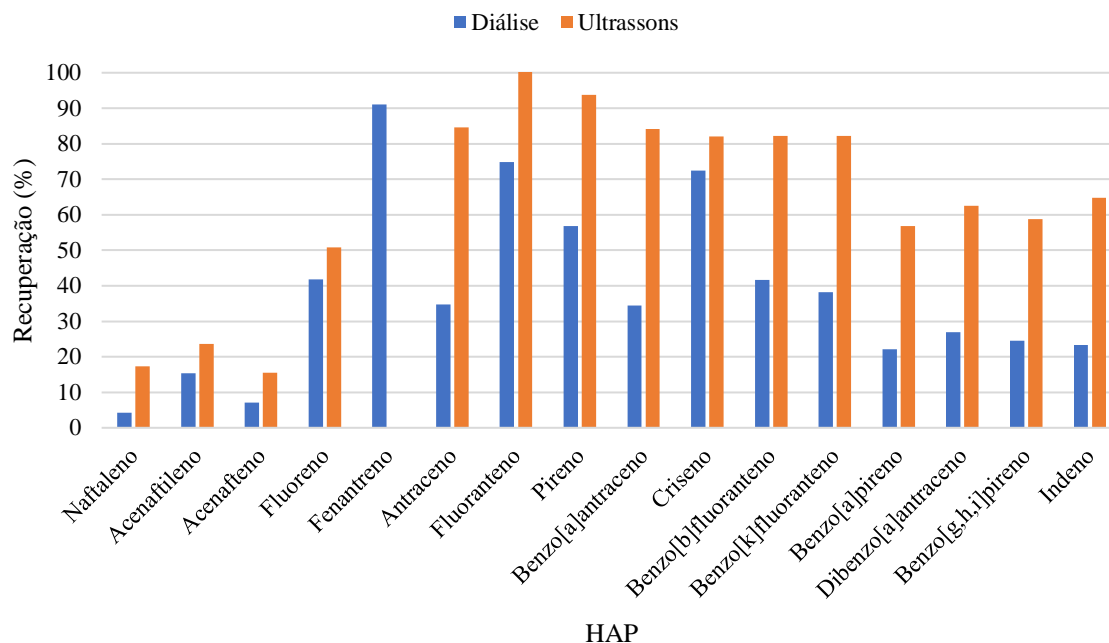


Gráfico 3.5 - Comparação das recuperações obtidas pelo o método de diálise e ultrassons

Pelo Gráfico 3.5, verifica-se que o método de extração em que foram obtidos os melhores valores de recuperação, dos compostos em estudo, foi com método otimizado com ultrassons. Este método revela ser o mais vantajoso, uma vez que estes valores de recuperação são obtidos com menor tempo de extração (30 + 30 + 30 min) comparativamente ao método clássico (16h + 6h).

Independentemente do método, verifica-se novamente recuperações mais baixas para os compostos de menor massa molecular, que são simultaneamente os compostos de menor $\log K_{ow}$. Estas perdas podem ser justificadas por duas razões: os compostos são provavelmente perdidos ao longo do processo de extração e de tratamento da amostra, ou devido às suas características físico-químicas, nomeadamente valores de $\log K_{ow}$ mais baixos que os restantes compostos do grupo, o que dificulta a sua captação pelo amostrador SPMD.

3.3. Estudo comparativo entre as técnicas de preparação de amostra na recuperação de HAP: SPE vs ASE

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica muito utilizada nos ensaios de rotina da EPAL em águas com diferentes origens, na monitorização de vários compostos, entre os quais os HAP. Foram comparados os valores de recuperação médios, dos HAP, obtidos por extração em fase sólida (SPE) com as recuperações obtidas pela técnica de extração acelerada por solvente (ASE), idealizada para extrair compostos de matrizes sólidas. Os procedimentos das duas técnicas encontram-se descritos nos pontos 2.4.1 e 2.4.2. No Gráfico 3.6 estão indicados os valores de recuperação obtidos pelas duas técnicas.

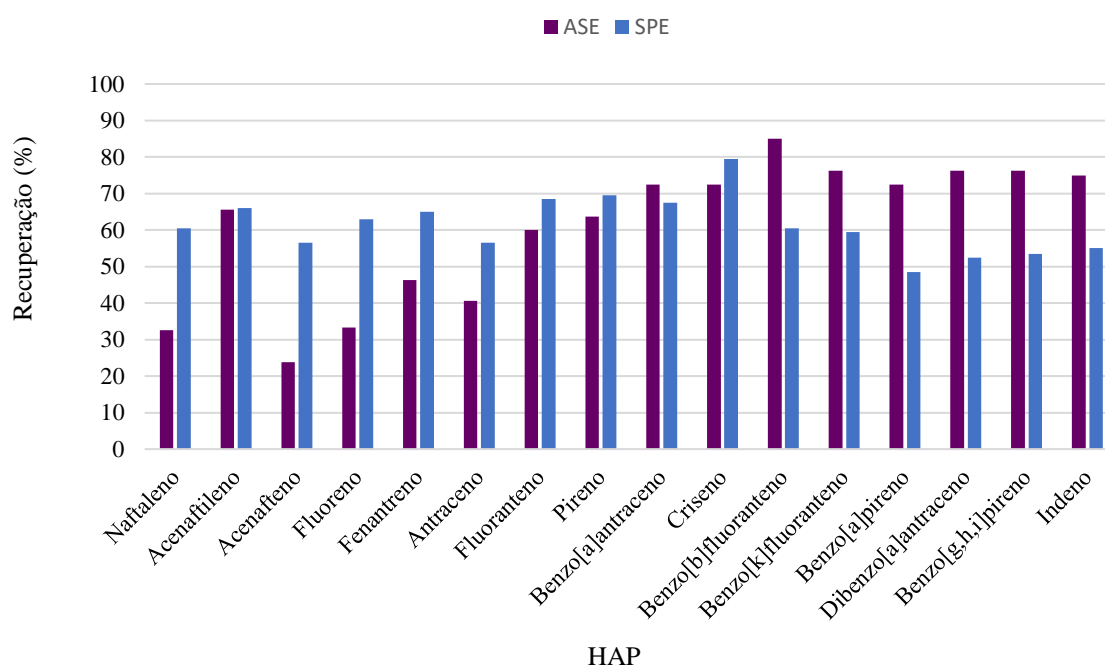


Gráfico 3.6 - Comparação da recuperação com as duas técnicas: ASE vs SPE

As percentagens de recuperação obtidas pela técnica da ASE (n=3) variam entre 24% (Acenafteno) e 85% (Benzo[b]fluoranteno), com desvio padrão relativo entre 0% (Indeno) e 37% (Acenaftileno).

O intervalo de recuperações para cada HAP com a técnica de SPE é entre 48,5% (Benzo[a]pireno) e 79,5% (Criseno).

As principais diferenças entre a eficácia dos dois métodos encontram-se diretamente relacionada com a massa molecular dos compostos: pelo Gráfico 3.6 verifica-se que, para a maioria dos compostos de menor massa molecular (Naftaleno - Fluoranteno), a técnica que apresenta melhores resultados é a SPE. No entanto, os compostos de maior massa molecular (Benzo[k]fluoranteno – Indeno) apresentam melhores recuperações com a técnica da ASE.

3.4. Estudo inicial do método preparação de amostra: ASE

A eficiência da extração acelerada por solvente na recuperação dos HAP, a partir dos amostradores SPMD, foi também experimentada com diferentes solventes. Neste caso, foram escolhidos três solventes orgânicos apolares – o ciclohexano, hexano e diclorometano – para estudar o seu efeito extrativo. O Gráfico 3.7 compara as recuperações com os diferentes solventes.

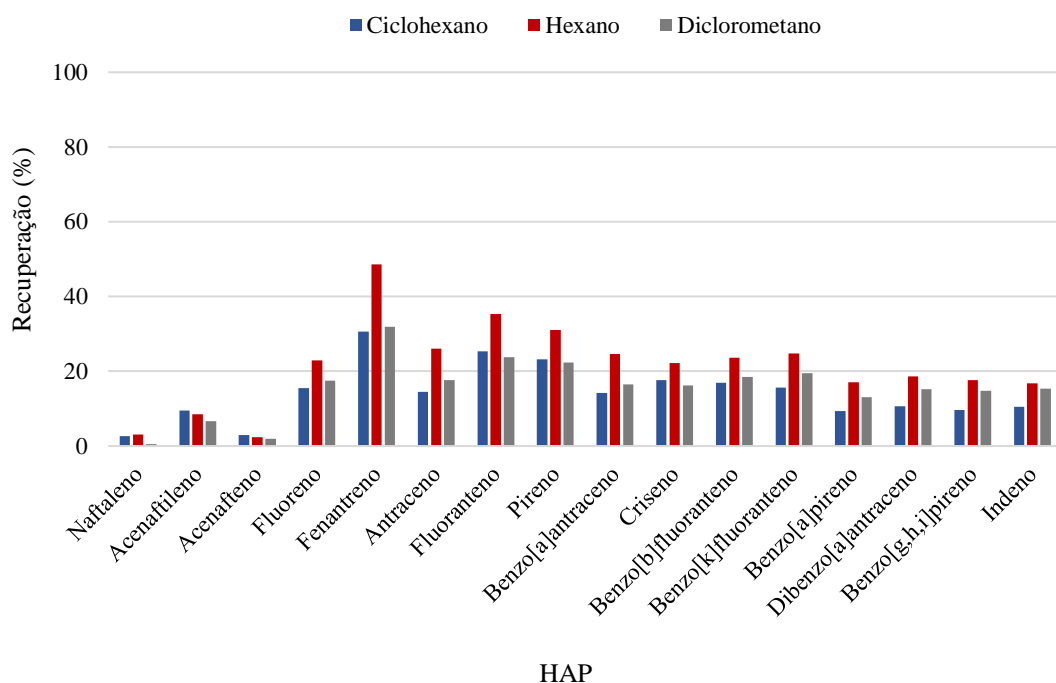


Gráfico 3. 7 – Comparação das recuperações obtidas pela ASE, a 50 °C, com ciclohexano, hexano e diclorometano

Pelo Gráfico 3.7 constata-se que o melhor solvente para ser usado na ASE, para a generalidade dos compostos, é o hexano. Verificam-se, nestas condições experimentais, menores percentagens de recuperação relativamente com o método de ultrassons, sendo o maior valor encontrado de 49% para o Fenantreno com o solvente hexano.

O método de ultrassons mostrou ser o método mais adequado na extração dos HAP dos amostradores passivos.

3.5. Utilização dos amostradores passivos no Reservatório dos Olivais

Os amostradores passivos, nomeadamente o SPMD, o POCIS-Pesticidas e o POCIS-Fármacos, foram colocados no Reservatório dos Olivais durante dois períodos distintos: 10 dias e 6 meses, com a finalidade de monitorizar hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e captar outros compostos orgânicos desconhecidos, possivelmente existentes no reservatório. Em cada momento de amostragem colocaram-se amostradores em duplicado (n=2) com o intuito de fazer uma comparação dos resultados obtidos. As condições gerais da extração dos HAP e dos compostos desconhecidos, para os diferentes amostradores, encontram-se descritas na Tabela 3.1.

Tabela 3. 1 - Condições de extração para os amostradores passivos

	SPMD	POCIS-Pesticidas	POCIS-Fármacos
Tipo de extração	Ultrassons ¹	ASE ²	ASE ²
Solvente	Ciclohexano	Metanol:Tolueno: Diclorometano (1:1:5)	Metanol:Tolueno: Diclorometano (1:1:5)
Temperatura	≈ 25 °C	t.a ³	t.a ³
Compostos a monitorizar	HAP/desconhecidos	desconhecidos	desconhecidos

¹Condições otimizadas: extração fracionada (30 + 30 + 30 min), 250 mL de solvente

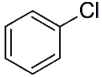
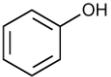
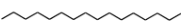
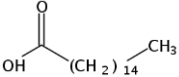
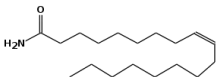
²Condições da ASE: Volume da célula – 34 mL; modo de extração – Fluxo; tempo estático – 10 minutos; ciclos estáticos – 4; Fluxo – 1 mL/min; Volume solvente – 60%; Pressão – 1500 psi

³O forno encontra-se desligado e a extração foi efetuada à temperatura ambiente (t.a)

A escolha das condições de extração do POCIS-Pesticidas e do POCIS-Fármacos têm como base, não só as características dos amostradores, mas também o tipo de compostos que se pretendem monitorizar que, neste caso, possuem propriedades desconhecidas. O uso de temperaturas baixas na extração evita a volatilização/degradação dos compostos e, simultaneamente, a extração excessiva de interferentes. O uso da mistura de solventes com diferentes polaridades permite a extração de uma maior variedade de compostos. Artigos científicos sobre o amostrador POCIS [46-48] e estudos relacionados com a extração de pesticidas em amostradores passivos [49] e a extração de HAP em lamas por ASE [54] sustentam a escolha destas condições extrativas.

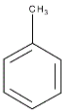
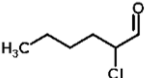
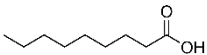
Nas Tabelas 3.2, 3.3 e 3.4 estão indicados os compostos orgânicos desconhecidos captados pelos amostradores durante 10 dias de exposição no Reservatórios dos Olivais. No caso dos amostradores POCIS, estão ainda indicadas as concentrações de cada composto nos respetivos amostradores.

Tabela 3. 2 - Compostos orgânicos desconhecidos detetados pelo amostrador POCIS Pesticidas (n=2) com 10 dias de exposição

Composto	Estrutura química	Tempo de retenção (min)	MF	RMF	Probabilidade	Massa no amostrador (µg)
Cloreto de benzilo		24,636	866	941	63,20%	7,1
Fenol*		23,327	775	904	39,80%	6,8
Hexadecano*		35,094	946	948	49,90%	46,5
Ácido n-hexadecanóico*		38,97	786	899	66,80%	44,5
(Z)-9-octadecenamida		42,709	908	923	94,40%	72,5

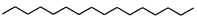
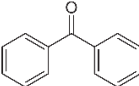
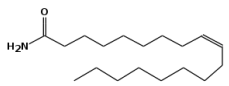
*Identificação Positiva

Tabela 3. 3 - Compostos orgânicos desconhecidos detetados pelo amostrador SPMD (n=2) com 10 dias de exposição

Composto	Estrutura química	Tempo de retenção (min)	MF	RMF	Probabilidade
Tolueno		13,490	958	959	63,3%
2-clorohexanal		19,972	876	878	97%
Ácido nonanóico*		30,478	884	884	80,10%

*Identificação Positiva

Tabela 3. 4 - Compostos orgânicos desconhecidos detetados pelo amostrador POCIS Fármacos (n=2) com 10 dias de exposição



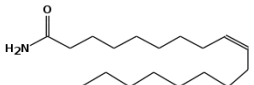
Composto	Estrutura química	Tempo de retenção (min)	MF	MF	Probabilidade	Massa no amostrador (µg)
Hexadecano*		35,094	947	950	44,40%	76,5
Benzofenona		35,844	920	964	84,60%	40,5
Octadecano*	$\text{H}_3\text{C} \left[\text{CH}_2 \right]_{16} \text{CH}_3$	37,434	933	944	41,90%	76,9
Eicosano*	$\text{H}_3\text{C} \left[\text{CH}_2 \right]_{18} \text{CH}_3$	39,349	935	953	50,90%	86,4
(Z)-9-octadecenamida		42,709	908	923	94,40%	84,4

*Identificação Positiva

Relativamente aos HAP, não foram encontrados vestígios significativos no Reservatório dos Olivais durante o período de exposição de 10 dias.

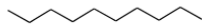
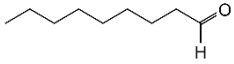
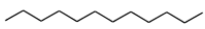
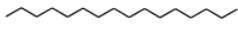
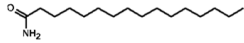
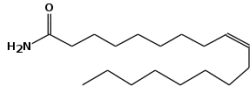
Nas Tabelas 3.5, 3.6 e 3.7 estão indicados os compostos orgânicos desconhecidos captados pelos amostradores durante 6 meses, no mesmo local.

Tabela 3. 5 - Compostos orgânicos desconhecidos detetados pelo amostrador POCIS Pesticidas (n=2) com 6 meses de exposição

Composto	Estrutura química	Tempo de retenção (min)	MF	RMF	Probabilidade
Decano		24,19	945	954	55,80%
Undecano*		27,036	941	948	45%
(Z)-9-octadecenamida		42,718	916	924	92,80%

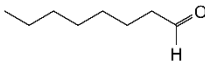
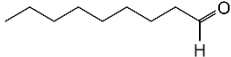
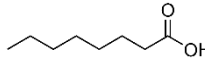
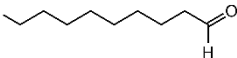
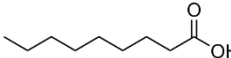
*Identificação Positiva

Tabela 3. 6 - Compostos orgânicos desconhecidos detetados pelo amostrador POCIS Fármacos (n=2) com 6 meses de exposição

Composto	Estrutura química	Tempo de retenção (min)	MF	RMF	Probabilidade
Decano*		24,076	942	957	49,90%
Nonanal*		27,158	934	937	78,60%
Dodecano*		29,212	943	945	42%
Hexadecano*		35,094	937	950	39,30%
Hexadecanamida		41,107	750	789	61%
(Z)-9-octadecenamida		42,709	908	923	94,40%

*Identificação Positiva

Tabela 3. 7 - Compostos orgânicos desconhecidos detetados pelo amostrador SPMD (n=2) com 6 meses de exposição

Composto	Estrutura química	Tempo de retenção (min)	MF	RMF	Probabilidade
Octanal*		24,154	949	978	86,90%
Nonanal*		27,158	935	936	81,30%
Ácido octanóico*		28,833	911	938	90,80%
Decanal*		29,364	926	930	67%
Ácido nonanóico*		30,683	754	776	24,30%

*Identificação Positiva

Relativamente aos HAP, não foram encontrados vestígios significativos nos amostradores SPMD durante o período de exposição de 6 meses.

Os compostos indicados com * foram ainda identificados por comparação com o tempo de retenção do composto obtido com um padrão puro – essa identificação é positiva no que respeita ao seu nível de confiança. Os restantes compostos são classificados como tentativa de identificação, tal como indicado no ponto 2.6.10.

É de referir que períodos de amostragem muito longos criam problemas durante o tratamento dos resultados, devido à acumulação de sujidade e formação de biofilme nos amostradores, o que influencia a composição da amostra final e dificulta a leitura dos respetivos cromatogramas. Períodos menos extensos de amostragem, entre uma a duas semanas, são suficientes para se obterem resultados aceitáveis com estes dispositivos.

Nos sistemas de abastecimento, a água destinada para consumo humano entra em contacto com várias infraestruturas e, particularmente, com inúmeros materiais e produtos, durante a sua captação, elevação, tratamentos, adução, armazenamento e distribuição, podendo ter um impacto na sua qualidade.

Apesar de ainda não existir um sistema nacional para a certificação de materiais e produtos em contacto com a água de consumo humano, a EPAL reconhece a sua importância e, como tal, desenvolveu e implementou um sistema para aprovação deste tipo de materiais, de modo a assegurar que não provocam alterações na qualidade da água.

Nos sistemas de abastecimento, os principais materiais são: betão, argamassas de ligantes hidráulicos e seus componentes (cimentos, aditivos, adjuvantes e fibras), plásticos, compósitos de matrizes poliméricas, elastómeros e metálicos, sobretudo componentes de aço-não ligado e de ferro fundido. A rede de distribuição de Lisboa é constituída essencialmente por betão armado, ferro fundido, fibrocimento e polietileno de alta densidade. ^[49]

A maioria dos compostos desconhecidos detetados no Reservatório dos Olivais são compostos orgânicos alifáticos (hexadecano, decano, dodecano), aldeídos (octanal, nonanal, decanal) e ácidos carboxílicos (ácido octanóico, ácido nonanóico) que proveem, essencialmente, das massas lubrificantes usadas. Foi também detetada, em menores concentrações, a presença de compostos organoclorados (cloreto de benzilo, 2-clorohexanal), subprodutos resultantes do processo de desinfecção com cloro. O composto (Z)-9-octadecenamida foi detetado pelas duas configurações do POCIS, nos dois momentos de amostragem (10 e 6 meses). Este composto é usado como agente lubrificante e inibidor da corrosão.

Relativamente à ausência de HAP no reservatório, conclui-se que a água de consumo apresenta uma qualidade excelente.

4. Conclusões e Perspetivas Futuras

Com base nos resultados obtidos com a utilização dos amostradores passivos, é possível concluir que este tipo de amostragem é uma ferramenta valiosa na monitorização da qualidade da água, em ambientes onde se encontram quantidades vestigiais de poluentes, na ordem dos μg . Devido ao seu carácter acumulativo, os amostradores passivos permitem monitorizar águas durante um certo intervalo de tempo e detetar alguns compostos orgânicos que através de amostragem tradicional pontual não é possível detetar.

O presente trabalho serve de suporte científico para outros possíveis estudos no âmbito da amostragem passiva e os resultados apresentados devem servir como um guia para o planeamento e desenvolvimento de eventuais metodologias na monitorização de HAP e outros compostos orgânicos com este tipo de dispositivos.

Neste estudo, o amostrador passivo SPMD, idealizado para acumular compostos apolares, demonstrou ter uma grande afinidade com os HAP. Os vários ensaios de simulação no laboratório com este amostrador contribuíram para a otimização de um método eficiente de recuperação do grupo dos 16 HAP prioritários em estudo, permitindo a escolha definitiva das melhores condições para, posteriormente, os amostradores serem colocados em diversos reservatórios de água para monitorizar compostos apolares, como os HAP.

O método da extração, otimizado com o sistema de ultrassons, é realizado com 250 mL de ciclohexano a cada 30 minutos durante 1h 30min, com uma temperatura do banho de água $\approx 25^\circ\text{C}$. O extrato final é posteriormente filtrado com um filtro de PTFE com $0,22\ \mu\text{m}$ de tamanho dos poros, sendo depois analisado por HPLC-DAD-FLD. Para estas condições, foram encontradas percentagens de recuperação entre 17% (Naftaleno) e 100% (Fluoranteno). No entanto, a utilização deste filtro não exclui todos os interferentes, o que dificulta a determinação rigorosa da percentagem de recuperação do Fenantreno.

Relativamente aos ensaios de simulação na extração dos HAP pelo sistema ASE, verificaram-se percentagens de recuperação entre 24% (Acenafteno) e 85% (Benzo[b]fluoranteno). A técnica da ASE foi então aplicada na extração da membrana SPMD e o melhor solvente para o efeito foi o hexano.

Relativamente à monitorização de HAP no Reservatório dos Olivais, não foram encontrados vestígios significativos neste local. Quanto a outros compostos orgânicos, constatou-se que os amostradores possuem afinidade para compostos constituintes de massas lubrificantes e compostos formados durante o processo de desinfecção das águas com cloro.

Futuramente, é de interesse da EPAL, a implementação dos amostradores passivos no terreno, sendo importante a continuação dos estudos com os mesmos. Deverão ser realizados mais ensaios de recuperação a partir amostradores com o sistema ASE, sendo este um equipamento muito promissor na área da química analítica. Deve-se ter em conta o estudo da influência das diferentes variáveis, como a temperatura, o modo de extração, o número e a duração dos ciclos. Devem também ser estudadas outras técnicas de tratamento de amostra e *clean-up* mais eficazes.

A participação em ensaios interlaboratoriais para a análise dos 16 HAP com os amostradores passivos deve também ser realizada para avaliar o desempenho do método desenvolvido.

Devem ser realizadas outras campanhas de amostragem com a aplicação dos mostradores passivos, por exemplo, em rios ou em massas de águas perto de zonas atingidas por incêndios, considerando as épocas sazonais de maior e menor precipitação.

Por fim, devem ser implementadas análises de rotina de forma a aumentar o histórico de resultados e, desta forma avaliar a possibilidade de solicitar ao Instituto Português da Acreditação (IPAC) a extensão da acreditação para este método de ensaio.

5. Bibliografia

- [1] WHO (World Health Organization), Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs391/en/> (Citado: 12 de Dezembro de 2017)
- [2] Klučárová V, *Development of method of isolation and purification of PAHs from exposed semipermeable membrane devices (SPMDs) prior to GC-MS analysis*, Acta Chimica Slovaca, pp. 281-287, 2013
- [3] EPAL (Empresa Portuguesa das Águas Livres, SA.), Disponível em: <https://www.epal.pt/EPAL/menu/%C3%A1gua/controlo-da-qualidade-da-%C3%A1gua> (Citado: 20 de Agosto de 2018)
- [4] EPAL (Empresa Portuguesa das Águas Livres, SA.), Disponível em <https://www.epal.pt/EPAL/menu/epal/quem-somos> (Citado: 10 de Novembro de 2018)
- [5] EPAL (Empresa Portuguesa das Águas Livres, SA.), Disponível em: <https://www.epal.pt/EPAL/menu/%C3%A1gua/sistema-de-abastecimento> (Citado 5 de Março de 2018)
- [6] EPAL, (Empresa portuguesa das Águas Livres, SA.) Disponível em: <http://www.epal.pt/EPAL/menu/produtos-e-servi%C3%A7os/laborat%C3%B3rios-de-ensaio-e-amostragem> (Citado: 18 de Novembro de 2017)
- [7] Yu H, *Environmental carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons: photochemistry and phototoxicity*, J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol, pp. 1-43, 2013
- [8] Skupinska K, *Polycyclic aromatic hydrocarbons: physicochemical properties, environmental appearance and impact on living organisms*, Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, pp. 233-240, 2004
- [9] Edokpayi J et al, *Determination and distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in rivers, sediments and wastewater effluents in Vhembe District, South Africa*, Int J Environ Res Public Health, pp. 1-12, 2016
- [10] Rengarajan T et al, *Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer*, Asian Pac J Trop Biomed, pp. 182-189, 2015
- [11] Zelinkova Z, Wenzl T, *The Occurrence of 16 EPA PAHs in Food – A Review*, polycyclic aromatic compounds, pp. 248-284, 2015
- [12] SFC (Scientific Committee on Food), *Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food*, pp. 1-84, 2002
- [13] NIST (National Institute of Standards and Technology), Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/> (Citado: 27 de Novembro de 2017)

-
- [14] WOM (World Health Organization), *Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons*, 202, 1998, Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm> Citado: 24 de Novembro de 2017
- [15] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), *Case Studies in Environmental Medicine Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)*, pp. 1-68, 2009
- [16] Abdel-Shafy H, *A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation*, Egyptian Journal of Petroleum, pp. 1-17, 2015
- [17] WHO, Air Quality Guidelines - Second Edition, 5.9, pp.3-7, 2000
- [18] IARC (International Agency For Research on Cancer), *Some Non-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures*, pp. 36-37, 2010
- [19] LNEC (Laboratório Nacional de Engenharia Civil), *Análise do impacte dos fogos florestais na qualidade química das águas superficiais e subterrâneas das áreas de estudo da Região Centro*, pp. 30-38, 2008
- [20] Silva V et al, Efeitos dos fogos florestais nos sistemas aquáticos, CAPTAR, pp. 68-77, 2016
- [21] ICNF (Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas), *6.º Relatório Provisório de Incêndios Rurais – 2018 - 01 de Janeiro a 15 de Setembro*, pp. 3-4, 2018
- [22] Efigénio L, Artigo do Jornal Público: “Câmara da Covilhã avança com acções de estabilização de solos em áreas ardidas”, 13 de Dezembro de 2017
- [23] Chimuka L et al, *Monitoring of Aquatic Environments Using Passive Samplers*, The Open Analytical Chemistry Journal, pp. 1-9, 2008
- [24] Górecki T, Namiesnik J, *Passive Sampling*, in *Trends in Analytical Chemistry*, Elsevier Science B.V, 2002, pp. 276-291
- [25] Kot-Wasik A et al, *Advances in Passive Sampling in Environmental Studies*, Anal. Chim. Acta, pp. 141-163, 2007
- [26] Seethapathy S et al, *Passive Sampling in environmental analysis*, Journal of Chromatography A, pp. 234-253, 2008
- [27] Vrana B, *Performance of Semipermeable Membrane Devices for Sampling of Organic Contaminants in Groundwater*, J. Environ. Monit., pp. 500-508, 2005
- [28] AmbiFirst – Monitorização Ambiental Unip. Lda, Disponível em: <http://ambifirst.pt/produtos/amost-pass-exposmeter/> (Citado: 1 de Fevereiro de 2018)
- [29] Ahrens L, *Characterization of five passive Sampling Devices for Monitoring of Pesticides in Water*, Journal of Chromatography A, pp. 1-11, 2015

-
- [30] ISO 5667-23: Water Quality – Sampling, *Part 23: Guidance on Passive Sampling in Surface Waters*, 2011
- [31] Kot A et al, *Passive Sampling for long-term Monitoring of Organic Pollutants in waters*, in *Trend in Analytical Chemistry*, pp. 446-458, 2000
- [32] Cal A et al, *Evaluation of the aquatic passive sampler Chemcatcher for the monitoring of highly hydrophobic compounds in water*, *Talanta*, pp.327-332, 2008
- [33] Yao Y, *The Combination of DGT Technique and Traditional Chemical Methods for Evaluation of Cadmium Bioavailability in Contaminated Soils with Organic Amendment*, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, pp. 595, 2016
- [34] Vrana B et al, *Passive Sampling Techniques for Monitoring Pollutants in Water*, in *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 845-868, 2005
- [35] Esteves-Turillas F et al, *New Perspectives in the use of Semipermeable Membrane Devices as Passive Samplers*, *Talanta*, pp. 443-457, 2008
- [36] ExposeMeter – Sampling Technologies, Descrição do produto: *EWL – Exposmeter Lopophilic for water*
- [37] Petty J et al, *Considerations involved with the use of Semipermeable Membrane Devices for Monitoring Environmental Contaminants*, *Journal of Chromatography A*, pp. 83-95, 2000
- [38] Huckins J, *Fundamentals of SPMDs*, in *Monitors of Organic Chemicals in the Environment*, Springer US, pp. 29-41, 2006
- [39] Yusà V et al, *Microwave-assisted Extraction of OCPs, PCBs and PAHs concentrated by semi-permeable membrane devices (SPMDs)*, *Analytica Chimica Acta*, pp. 355–366, 2005
- [40] Wenzel K et al, *Dialysis of Persistent Organic Pollutants and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Semipermeable Membranes. A Procedure Using an Accelerated Solvent Extraction Device*, *Anal. Chem*, pp.5503-5509, 2004
- [41] Lebo J et al, *Use of Semipermeable Membrane Devices for in situ Monitoring of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aquatic Environments*, *Chemosphere*, pp. 697-718, 1992
- [42] Huckins J et al, *Determination of Uptake Kinetics (Sampling Rates) by Lipid-Containing Semipermeable Membrane Devices (SPMD) for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons PAHs in Water*, *Environ. Sci. Technol.*, pp. 3918-3923, 1999
- [43] Bustamante J et al, *Ultrasound Assisted Dialysis of Semi-permeable Membrane devices for the Simultaneous Analysis of a wide number of Persistent Organic Pollutants*, *Talanta*, pp. 32-37, 2013
- [45] Mazella N, *Determination of kinetic and equilibrium regimes in the operation of polar organic chemical integrative samplers Application to the passive sampling of the polar herbicides in aquatic environments*, *Journal of Chromatography A*, pp. 42-51, 2007

-
- [45] ExposMeter – Sampling Technologies, Descrição do produto: *EPH – Exposer Hydrophilic for water*.
- [46] Morin N et al, *Chemical Calibration, Performance, Validation and Applications of the Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) in Aquatic Environments*, Trends in Analytical Chemistry, pp.144.175, 2012
- [47] Li H et al, *Sampling in the Great Lakes for Pharmaceuticals, Personal care products and Endocrine-Disrupting Substances using the Passive Polar Organic Chemical Integrative Sampler*, Environmental Toxicology and Chemistry, pp. 751–762, 2010
- [48] Bayen S, *Application of Polar Organic Chemical Integrative Sampler (POCIS) to monitor emerging contaminants in tropical waters*, Science of the Total Environment, pp. 15–22, 2014
- [49] Bernardino M, *Amostradores Passivos: Implementação e Validação em Águas*, FCT, 2017
- [50] Mitra S, Brukh R, *Sample Preparation: An Analytical Perspective*, in *Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, Wiley, 2003, pp. 1-35
- [51] Kelker H et al, *Analytical Chemistry: Purpose and Procedures*, in *Handbook of Analytical Chemistry*, Wiley-VCH, pp. 1-20, 2001
- [52] US EPA (United States Environmental Protection Agency), *Selection and Application of an Analytical Method*, 2004, pp-1-43,
- [53] Harvey D, *The language of Analytical Chemistry*, in *Modern Analytical Chemistry*, McGraw-Hill, 2004, pp. 35-52
- [54] Antunes P, *Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em Lamas: Validação do Método de Análise por ASE-HPLC-FLD-DAD*, FFUL, 2017
- [55] Bernardo C et al., *Efeito do ultrassom na extração e modificação de amidos*, Ciência Rural, 2016, pp.740-746
- [56] Bruni G et al, *Estudo do Método de Ultrassom para a Extração de Óleo de Sementes de Uva provenientes de Rejeitos do Processo Vinícola*, XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, pp. 1-8, 2014
- [57] Chemat F et al, *Ultrasound Assisted Extraction of Food and Natural Products. Mechanisms, Techniques, Combinations, Protocols and Applications - A Review*, Ultrasonics Sonochemistry, pp. 11-13, 2016
- [58] Shirsath S et al., *Intensification of Extraction of Natural Products using Ultrasonic Irradiations - A Review of Current Status*, Chemical Engineering and Processing, pp. 10-23, 2012
- [59] Poole C, *Principles and Practice of Solid Phase Extraction*, in *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, pp. 341-347, 2002

-
- [60] Majewska M et al, *Solid Phase Extraction*, in *Food Analysis in Food Chemistry and Biotechnology*, Scientific bulletin of The Technical University of Lodz, pp. 5-13, 2008
- [61] Penetra A, *Validação do Método de Ensaio para Análise de Pesticidas Organofosforados e Azotados por Cromatografia Gasosa utilizando como Método de Preparação da Amostra a Extração em Fase Sólida*, FCUL, pp. 47-55, 2003
- [62] Jardim I, *Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas*, Scientia Chromatographica, pp. 13-25, 2010
- [63] Macherey-Nagel, *Solid Phase Extraction Application Guide*, pp. 3-5
- [64] Yusa V, *Application of accelerated solvent extraction followed by gel performance chromatography and HPLC for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in mussel tissue*, Food Additives and Contaminants, pp. 482-489, 2005
- [65] Thermo Scientific, *Simultaneous extraction of PAHs and PCBs from Environmental Samples Using Accelerated Solvent Extraction*, 2012
- [66] Thermo Scientific, *Thermo Scientific Dionex ASE 350 Accelerated Solvent Extraction System*, 2016
- [67] Thermo Scientific, *Dionex ASE 350 Accelerated Solvent Extraction Operator's Manual*, 2011
- [68] Richter B et al, *Accelerated Solvent Extraction: A technique for Sample Preparation*, Anal. Chem., pp. 1033-1039, 1996
- [69] Thermo Scientific, *Use of Accelerated Solvent Extraction to Improve Laboratory Workflow*, 2013
- [70] Giergielewicz-Mozajka H et al, *Accelerated Solvent extraction (ASE) in the Analysis of Environmental Solid Samples – Some Aspects of Theory and Practice*, Critical Reviews in Analytical Chemistry, pp 149-165, 2001
- [71] Sun H, *Application of accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed*, J. of Chromatography, pp. 1-23, 2012
- [72] Thermo Scientific, *Methods Optimization in Accelerated Solvent Extraction*, 2013
- [73] ThermoFisher Scientific, Disponível em:
<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/068105?SID=srch-srp-068105>
(Citado: 07 de Junho de 2018)
- [74] ThermoFisher Scientific, Catálogo de produtos, Disponível em:
<https://www.thermofisher.com/search/browse/category/us/en/602455/Chromatography+Instruments+%26+Equipment%2FChromatography+Sample+Preparation+Equipment+%26+Accessories>
(Citado: 07 de Junho de 2018)

-
- [75] Milestone, Web seminar, *Modernizing Analysis of Trace Organic Compounds in Environmental Matrices*, 2018
- [76] Skoog et al., *Separações Cromatográficas*, in: *Fundamentos de Química Analítica*, Thomson, pp.875- 898, 2006
- [77] Gunzler H, Williams, *A Basic Principles of Chromatography*, in *Handbook of Analytical Techniques*, WILEY-VCH, pp. 174-198, 2001
- [78] Gunzler H, Williams, *Liquid Chromatography*, in *Handbook of Analytical Techniques*, WILEY-VCH, pp. 261-323, 2001
- [79] Harris D, Introduction to Analytical Separations, in: *Quantitative Chemical Analysis*, 7^a ed, W. H. Freeman and Company, pp. 501, 526, 2007
- [80] Portal de Engenharia Química, Disponível em: http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?option=com_content&task=view&id=103&Itemid=, (Citado de Agosto 2018)
- [81] Waters, Disponível em: http://www.waters.com/waters/pt_PT/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=pt_PT, (Citado: 04 de Janeiro de 2018)
- [82] Chust R, *Introdução à Cromatografia de Líquidos (HPLC)*, Sociedade Portuguesa de Química, pp. 43-54, 1990
- [83] Harris D, *High-Performance Liquid Chromatography*, in: *Quantitative Chemical Analysis*, 7^a ed, W. H. Freeman and Company, pp. 501, 526, 2007
- [84] Arti T et al, *High Performance Liquid Chromatography Detectors – A review*, IRJP, pp. 1-7, 2011
- [85] Agilent Technologies, Disponível em: http://www.team-cag.com/support/theory/chroma/hplc_bas_at/detectors/dadPrinciple.html, (Citado: 24 de Abril de 2018)
- [86] Es'haghi Z, *Photodiode Array Detection in Clinical Applications; Quantitative Analyte Assay Advantages, Limitations and Disadvantages*, in *Photodiodes – Communications, Bio-Sensings, Measurements and High-Energy Physics*, pp. 161-182, 2011
- [87] Swartz M, *HPLC Detectors: A Brief Review*, J. Liq. Chromatography, pp. 1130–1150, 2010
- [88] Lingeman H et al, *Fluorescence Detection in High Performance Liquid Chromatography*, J. Liq. Chromatography, pp. 789-874, 1985
- [89] Thermo Fisher Scientific Inc, *UltiMate 3000 Series: Fluorescence Detectors FLD-3100 and FLD-3400RS - Operating Instructions*, pp. 16-18, 2013
- [90] Guia Relacre 13 – *Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química*, pp. 3-34, 2000

-
- [91] IPAC (Instituto Português de Acreditação), *Guia para a Aplicação da NP EN ISO/IEC 17025*, pp.12 – 13, 2010
- [92] Martins A, *Implementação e Validação de Métodos Analíticos*, FCTUC, 2016
- [93] Rodrigues A, *Determinação de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos em águas de abastecimento e superficiais por HPLC. Estudo comparativo entre métodos de preparação de amostra – Extracção líquido-líquido e Microextracção em Fase Sólida*, FCUL, 1999
- [94] Decreto-Lei n.º 236/98, de 1 de Agosto, *Diário da República*, 176, pp. 3676-3722, 1998
- [95] Decreto-Lei n.º 103/2010 de 24 de Setembro, *Diário da República*, I Série, 187, pp. 4289-4296, 2010
- [96] Decreto-Lei n.º 83/2011 de 20 de Junho, *Diário da República*, I Série, 117, pp. 3584-3587, 2011
- [97] Decreto-Lei n.º 218/2015 de 7 de Outubro, *Diário da República*, I Série, 196, pp. 8667-8665, 2015
- [98] Decreto-Lei n.º 306/2007 de 27 de Agosto, *Diário da República*, I Série, 164, pp. 5747-5765, 2007
- [99] Decreto-Lei n.º 152/2017 de 7 de Dezembro, *Diário da República*, I Série, 235, pp. 6555-6576, 2017
- [100] Mayer P et al, *Advancing Passive Sampling of Contaminants in Environmental Science*, J. of Royal Society of Chemistry, pp. 366–368, 2014
- [101] Aerd Statistics, Disponível em: <https://statistics.laerd.com/spss-tutorials/friedman-test-using-spss-statistics.php>, (Citado: 03 de Setembro de 2018)

6. Anexos

Anexo I - Legislação relativa à qualidade da água

Os requisitos da legislação comunitária são cada vez mais exigentes relativamente à qualidade da água, existindo atualmente a transposição da legislação comunitária para a legislação nacional, o que resulta na normalização das regulamentações existentes entre todos os Estados Membros.

O Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto, que resultou da transposição da Diretiva n.º 80/778/CEE, estabelece normas, critérios e objetivos de qualidade com a finalidade de proteger a saúde pública e a melhoria da qualidade da água utilizada ou destinada para a produção de água para consumo humano, em função dos seus principais usos, numa perspetiva de gestão integrada dos recursos hídricos e de preservação do ambiente. Define os requisitos necessários na utilização da água para os seguintes fins: águas de abastecimento para consumo humano, águas superficiais e subterrâneas destinadas à produção de água para consumo humano e águas para suporte da vida aquícula (águas piscícolas, águas conquícolas, águas balneares e águas de rega). Define também as normas de descarga das águas residuais na água e no solo. Atribui e clarifica ainda as competências de várias entidades intervenientes no domínio da qualidade da água, no respeito ao licenciamento, inspeção, fiscalização, vigilância sanitária, comunicação de resultados, classificação e inventário das águas. ^[94]

De uma forma geral, o decreto define as normas de qualidade e de verificação de conformidade, estabelecendo critérios relativos à frequência mínima de amostragem e análise para a monitorização da qualidade, bem como planos de ação e de gestão consoante a classificação das águas doces superficiais e subterrâneas destinadas à produção de água para consumo humano. De acordo com o decreto, são consideradas aptas para serem utilizadas na produção de água para consumo humano, águas subterrâneas que apresentem qualidade superior ou igual à da Categoria A1 das águas doces superficiais quando utilizadas para o mesmo fim.

Relativamente a compostos orgânicos a monitorizar em águas superficiais, o Decreto-Lei n.º 236/98 de 1 de Agosto foi revogado pelo Decreto-Lei n.º 103/2010 de 24 de Setembro que estabelece normas de qualidade ambiental (NQA) para as substâncias prioritárias e para outros poluentes, tendo em vista a redução gradual da poluição provocada por essas substâncias e a melhoria da qualidade das águas superficiais. Posteriormente este decreto-Lei sofreu algumas alterações aquando da publicação do Decreto-Lei n.º 83/2011 de 20 de Junho, no que respeita às especificações técnicas para a análise e monitorização dos parâmetros químicos caracterizadores do estado das massas de água superficiais e subterrâneas, garantindo assim a obtenção de dados significativos através de métodos analíticos validados, que devem cumprir determinados critérios de desempenho mínimo e requisitos gerais estabelecidos, de modo a garantir a deteção e medição fiáveis dos valores que excedem as NQA e assegurar também a qualidade e comparabilidade dos resultados analíticos dos laboratórios acreditados. ^[95, 96]

No seguimento dos decretos anteriores, surgiu o Decreto-Lei 218/2015 de 7 de Outubro que introduziu novos compostos orgânicos a monitorizar em águas superficiais e estabeleceu as normas

de qualidade ambiental, como objetivo o controlo da poluição, na qual se encontra a concentração admissível para cada poluente tendo em conta a toxicidade dos compostos. A Tabela 6.1 apresenta as normas de qualidade ambiental tendo em conta a concentração máxima admissível (NQA-CMA) e a média anual (NQ-MA) em águas superficiais de alguns HAP considerados poluentes prioritários no domínio da política da água. No caso NQA-MA, este parâmetro define que para uma dada massa de água de superfície, o cumprimento da norma de qualidade ambiental exige que, em cada ponto de monitorização representativo situado na massa de água, a média aritmética das concentrações medidas em momentos diferentes do ano não exceda o valor indicado na norma. ^[97]

Tabela 6. 1 - Normas de qualidade tendo em conta a concentração máxima admissível(NQA-CMA) e a média anual (NQA-MA) em águas superficiais de alguns HAP considerados poluentes prioritários.

Nome da Substância	NQA-CMA (µg/L)	NQA-MA (µg/L)
Antraceno	0,1	0,1
Fluoranteno	0,01	0,0063
Naftaleno	130	2
Benzo[a]pireno	0,027	$1,7 \times 10^{-4}$
Benzo[b]fluoranteno	0,017	*
Benzo[k]fluoranteno	0,017	*
Benzo[g,h,i]pirileno	$8,2 \times 10^{-3}$	*
Indenol[1,2,3-cd]pireno	Não Aplicável**	*

* a correspondente NQA -MA na água referem-se à concentração de benzo(a)pireno, em cuja toxicidade se baseiam. O benzo(a)pireno pode considerar-se um marcador dos outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, pelo que basta monitorizar o benzo(a)pireno para efeitos de comparação com a NQA -MA correspondente na água.

** Não existem dados suficientes para estabelecer normas NQA-CMA

No que diz respeito às águas de consumo, esta é regida atualmente pelo Decreto-Lei 306/2007 de 27 de Agosto, que revogou o Decreto-Lei 236/98 de 1 de Agosto, e estabelece o regime de qualidade da água destinada ao consumo humano, tendo por objetivo proteger a saúde humana dos efeitos nocivos resultantes da eventual contaminação dessa água e assegurar a disponibilização tendencialmente universal de água salubre, limpa e desejavelmente equilibrada na sua composição. Define as atribuições e competências das entidades gestoras dos sistemas de abastecimento público no que concerne a:

- Verificação das normas de controlo de qualidade da água,
- Elaboração, submissão à aprovação da Autoridade Competente (ERSAR - Entidade Reguladora dos Serviços de Águas e Resíduos), implementação e execução do programa de amostragem e de análise, tendo em vista a demonstração e verificação da conformidade da água distribuída, de acordo com as normas e requisitos definidos,
- Parâmetros da qualidade da água a analisar e as respetivas frequências mínimas de amostragem,

- Circuitos de informação às entidades competentes e aos consumidores sobre os dados da qualidade da água, comunicação e tratamento de incumprimentos de valores paramétricos e divulgação dos resultados de ações corretivas desenvolvidas,
- Tratamento da água destinada ao consumo humano,
- Utilização de materiais e produtos em contacto com a água,
- Garantia da melhoria contínua da qualidade da água fornecida, através de programas de controlo operacional de todos os sistemas de distribuição,
- Critérios de aptidão dos laboratórios de ensaio ^[98]

Para os HAP, o valor paramétrico definido no Decreto-Lei é de 0,1 µg/L e é referente à soma das concentrações dos seguintes compostos: benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[g,h,i]perileno e indeno[1,2,3-cd]pireno.

Recentemente, o Decreto-Lei 152/2017 de 7 de Dezembro, procedeu à alteração do Decreto-Lei 306/2007, de 27 de agosto, no que diz respeito a alguns valores paramétricos de substâncias químicas, radioativas e parâmetros microbiológicos. Relativamente aos HAP, não houve alterações nos valores anteriormente estabelecidos. ^[99]

Anexo II - Legislação relativa aos amostradores passivos e sua utilização na comunidade internacional

Os amostradores passivos podem ser utilizados para monitorizar concentrações de uma vasta gama de analitos, incluindo metais, aniões inorgânicos, compostos orgânicos polares (pesticidas, compostos farmacêuticos), compostos orgânicos apolares e produtos químicos industriais em ambientes aquáticos.

A ISO 5667-23:2011 especifica procedimentos para a determinação de concentrações médias ao longo do tempo e concentrações de equilíbrio de compostos presentes em águas superficiais por amostragem passiva. O documento fornece ainda informações sobre os princípios básicos de funcionamento dos amostradores, manuseamento, transporte, precauções de segurança, extração dos analitos e análise.

Nos últimos anos tem-se verificado um evidente interesse a nível mundial no uso de amostradores passivos para a monitorização ambiental. A aplicabilidade e confiabilidade desta tecnologia já é reconhecida, bem como as vantagens da sua utilização e a importância que pode desempenhar no controlo da qualidade da água. O recente surgimento do interesse na Europa tem sido, em parte, impulsionado pela legislação revista sobre a qualidade da água, nomeadamente a Diretiva Quadro da Água (2001) e a Diretiva Quadro da Estratégia Marinha (2008) introduzidas em toda a Comunidade. Vários grandes projetos de investigação e demonstração, financiados pela Comissão, têm revelado o potencial da amostragem passiva, usada em conjunto com outras técnicas, para monitorizar a qualidade da água dentro de um quadro regulatório. ^[100]

Atualmente, a amostragem passiva não é aplicada ainda na monitorização com conformidade regulamentar, uma vez que as NQA não estão definidas para este método. Diferentes conferências e encontros têm sido realizados por entidades ambientais no sentido de debater as questões de regulamentação. Em 2013, a Associação NORMAN (*Network of reference laboratories for monitoring emerging environmental pollutants*) organizou um evento que reuniu especialistas da área da amostragem e da toxicologia ambiental para debater a relação entre as NQA para vários poluentes com a respetiva concentração medida usando os amostradores passivos. ^[100]

No entanto, dispositivos como o SPMD já são usados por diferentes agências governamentais na monitorização de contaminantes orgânicos, como as Agências de Proteção Ambiental (*US EPA, Swedish EPA, Chzeck EPA, Australia EPA, UK EPA*) e outras entidades como a USGS (*United States Geological Survey*). A UK EPA adotou o SMPD como parte do seu programa de monitorização, acreditado segundo a ISO 17025 pelo Serviço de Acreditação do Reino Unido. O Instituto de Saúde Pública da República Checa também usa a tecnologia do SPMD como um método padrão. ^[36]

Anexo III – Condições de detecção dos HAP no detetor de fluorescência e respectivos tempos de retenção no cromatograma

Tabela 6. 2 - Condições de detecção dos HAP no detetor de fluorescência

Nome da Substância	λ excitação (nm)	λ emissão (nm)
Naftaleno	280	330
Acenaftileno	Detetor de díodos: 322,6	
Acenafteno	280	330
Fluoreno	280	330
Fenantreno	246	365
Antraceno	250	406
Fluoranteno	283	450
Pireno	270	388
Benzo[a]antraceno	283	396
Criseno	266	379
Benzo[b]fluoranteno	257	444
Benzo[k]fluoranteno	290	439
Benzo[a]pireno	265	413
Dibenzo[a,h]antraceno	294	404
Benzo[g,h,i]perileno	292	423
Indeno[1,2,3-cd]pireno	250	495

Tabela 6. 3 - Tempos de retenção aproximados dos HAP no cromatograma

HAP	Tempo de retenção (min)	HAP	Tempo de retenção (min)
Naf	6,7	BaA	14,7
Acenf	8,0	Cri	15,2
Acen	9,5	BbF	16,4
Flu	9,8	BkF	17,6
Fen	10,7	BaP	18,7
Ant	11,7	DahA	20,9
Flr	12,4	BghiP	21,1
Pir	13,0	Ind	23,6

Anexo IV – Cromatograma típico dos HAP obtido por HPLC-DAD-FLD

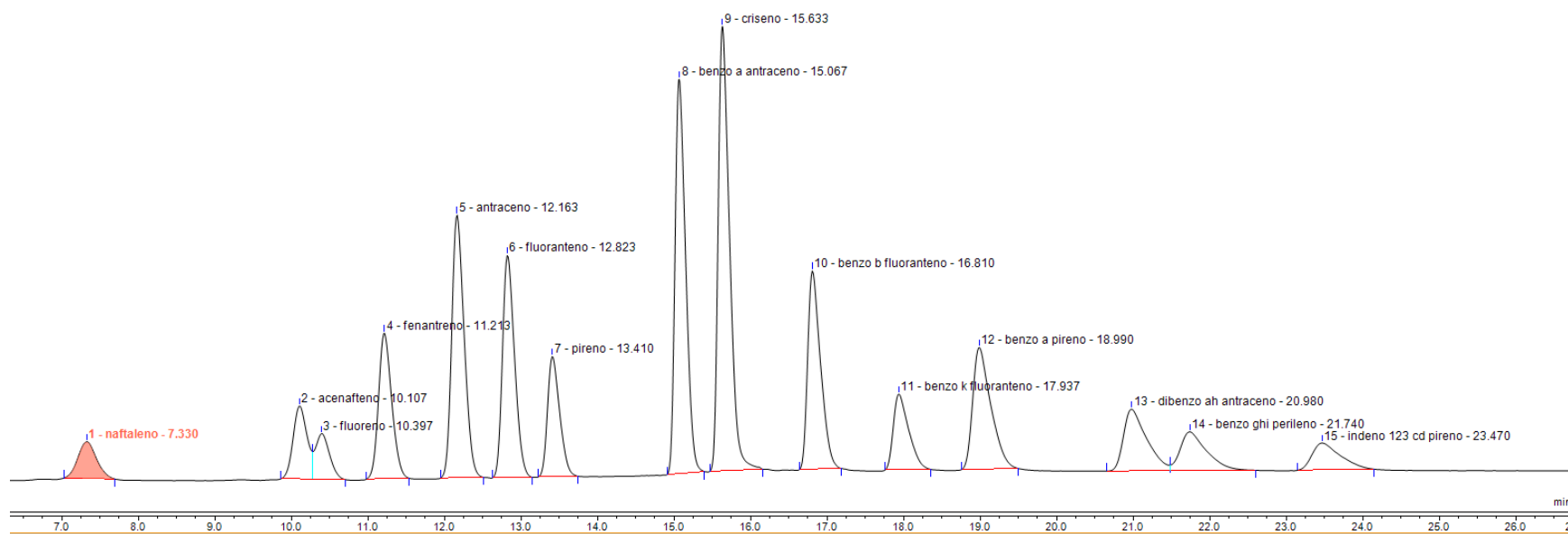


Figura 6. 1 - Cromatograma típico dos HAP obtido por HPLC-DAD-FLD

Anexo V – Resultados do Teste Estatístico dos Diferentes Dias de Exposição (SPSS)

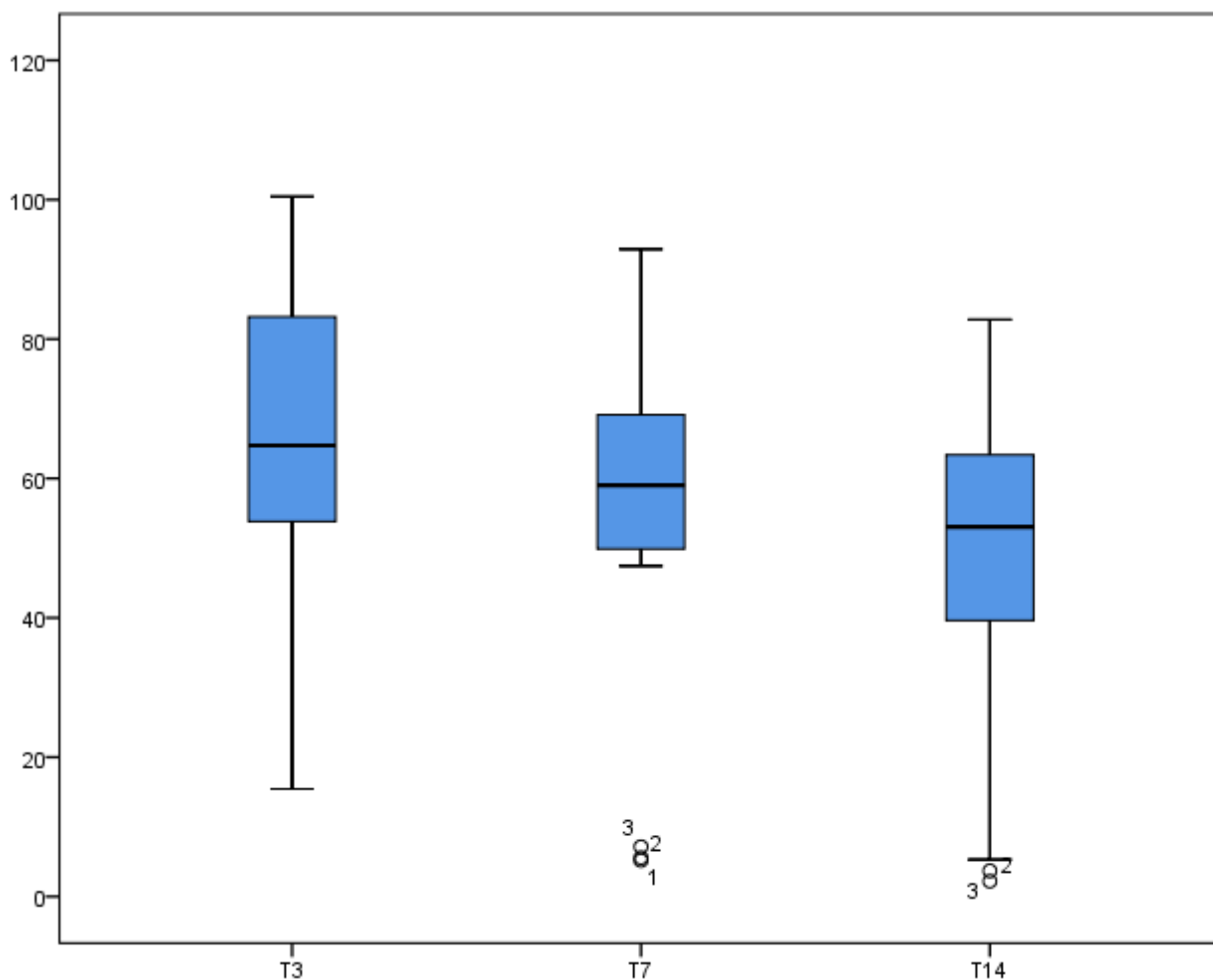


Gráfico 6. 1 - Blox-plot 1

Descriptives

			Statistic	Std. Error
T3	Mean		63.953125	7.0558871
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	48.819752	
		Upper Bound	79.086498	
	5% Trimmed Mean		64.620536	
	Median		64.732143	
	Variance		746.783	
	Std. Deviation		27.3273334	

	Minimum		15.4464	
	Maximum		100.4464	
	Range		85.0000	
	Interquartile Range		33.2589	
	Skewness		-.703	.580
	Kurtosis		-.578	1.121
T7	Mean		53.740074	7.1049103
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	38.501557	
		Upper Bound	68.978592	
	5% Trimmed Mean		54.262967	
	Median		59.017857	
	Variance		757.196	
	Std. Deviation		27.5171994	
	Minimum		5.1842	
	Maximum		92.8839	
	Range		87.6998	
	Interquartile Range		25.2571	
	Skewness		-.856	.580
	Kurtosis		-.063	1.121
T14	Mean		46.794036	6.5240454
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	32.801350	
		Upper Bound	60.786721	
	5% Trimmed Mean		47.270903	
	Median		53.033929	
	Variance		638.448	
	Std. Deviation		25.2675191	
	Minimum		2.2009	
	Maximum		82.8036	
	Range		80.6027	
	Interquartile Range		25.2179	
	Skewness		-.788	.580
	Kurtosis		-.276	1.121

Tests of Normality

	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
T3	.212	15	.068	.898	15	.087
T7	.213	15	.066	.871	15	.035
T14	.171	15	.200*	.893	15	.074

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

NPar Tests

Friedman Test

O teste de Friedman é a alternativa não paramétrica à ANOVA unidirecional com medidas repetidas. É usado para testar diferenças entre grupos quando a variável dependente medida é ordinal. Também pode ser usado para dados contínuos que não estão em concordância com as suposições necessárias para executar a ANOVA unidirecional com medidas repetidas. Este teste é usado num grupo que é estudado em três ou mais diferentes situações e em amostras que não necessitam de seguir uma distribuição normal. ^[101]

Ranks

	Mean Rank
T3	3.00
T7	2.00
T14	1.00

Test Statistics^a

N	15
Chi-Square	30.000
df	2
Asymp. Sig.	.000

a. Friedman Test

Anexo VI – Resultados do Teste Estatístico dos Diferentes Volumes de Solvente (SPSS)

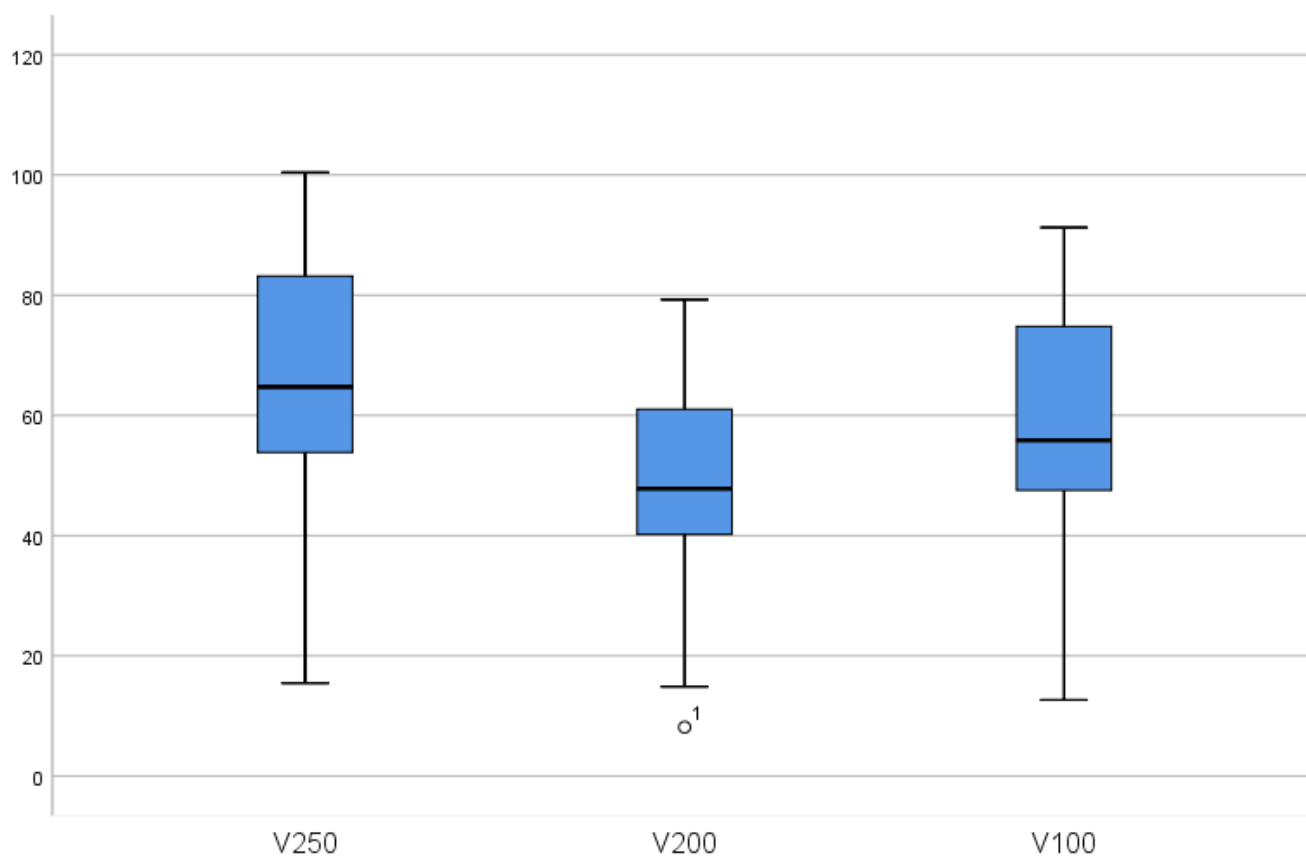


Gráfico 6. 2 - Blox-plot 2

Descriptives

		Statistic	Std. Error
V250	Mean	63.953125	7.0558871
	95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	48.819752
		Upper Bound	79.086498
	5% Trimmed Mean	64.620536	
	Median	64.732143	
	Variance	746.783	
	Std. Deviation	27.3273334	
	Minimum	15.4464	
	Maximum	100.4464	

	Range	85.0000	
	Interquartile Range	33.2589	
	Skewness	-.703	.580
	Kurtosis	-.578	1.121
V200	Mean	48.759107	5.2408637
	95% Confidence Interval for Lower Bound	37.518573	
	Mean Upper Bound	59.999642	
	5% Trimmed Mean	49.323115	
	Median	47.785714	
	Variance	412.000	
	Std. Deviation	20.2977777	
	Minimum	8.1161	
	Maximum	79.2500	
	Range	71.1339	
	Interquartile Range	22.4464	
	Skewness	-.588	.580
	Kurtosis	-.129	1.121
V100	Mean	58.327381	5.9791935
	95% Confidence Interval for Lower Bound	45.503286	
	Mean Upper Bound	71.151475	
	5% Trimmed Mean	59.034888	
	Median	55.848214	
	Variance	536.261	
	Std. Deviation	23.1573167	
	Minimum	12.6696	
	Maximum	91.2500	
	Range	78.5804	
	Interquartile Range	28.8214	
	Skewness	-.552	.580
	Kurtosis	-.386	1.121

NPar Tests

Friedman Test

Ranks

Mean Rank	
V250	2.73
V200	1.07
V100	2.20

Test Statistics^a

N	15
Chi-Square	21.733
df	2
Asymp. Sig.	.000

a. Friedman Test

